

Date Due

| | | | |
|---|---|---|---|
| IL 8874018 | | | |
| ERE 3/9/94 | | | |
| sent 5 vols. | | | |

Chemistry Division
Agri. Experiment Station
Bought of G. E. Stechert Co.
January 16, 1915

# HANDBUCH

DER

# BIOCHEMISCHEN ARBEITSMETHODEN.

BEARBEITET VON

Prof. Dr. **E. Abderhalden,** Berlin — Priv.-Doz. Dr. **D. Ackermann,** Würzburg — Prof. Dr. **Hans Aron,** Manila — Prof. Dr. **Baglioni,** Rom — Prof. Dr. phil. **Bartelt,** Peking — Prof. Dr. **Battelli,** Genf — Prof. Dr. **J. Biehringer,** Braunschweig — Dr. phil. **Carl Brahm,** Berlin — Priv.-Doz. Dr. **Theodor Brugsch,** Berlin — Prof. Dr. **Chodat,** Genf — Prof. Dr. **Cramer,** Edinburgh — Prof. Dr. **M. Dennstedt,** Hamburg — Prof. Dr. **Felix Ehrlich,** Breslau — Prof. Dr. med. **Embden,** Frankfurt a. M. — Prof. Dr. **St. Faust,** Würzburg — Priv.-Doz. Dr. **Friedenthal,** Nicolassee-Berlin — Prof. Dr. **E. Friedmann,** Berlin — Priv.-Doz. Dr. **Fuhrmann,** Graz — Prof. Dr. **Wm. J. Gies,** New-York — Priv.-Doz. Dr. **Grube,** Neuenahr-Bonn — Prof. Dr. **Olof Hammarsten,** Upsala — Priv.-Doz. Dr. **Hári,** Budapest — Dr. **M. Henze,** Neapel — Priv.-Doz. Dr. **Hildebrandt,** Halle a. S. — Priv.-Doz. Dr. **Rudolf Hoeber,** Kiel — Prof. Dr. **Jacoby,** Berlin — Prof. Dr. **Johannsson,** Stockholm — Dr. phil. **R. Kempf,** Berlin — Prof. Dr. **Kobert,** Rostock — Priv.-Doz. Dr. **Kostytschew,** St. Petersburg — Prof. Dr. **William Kuester,** Stuttgart — Prof. Dr. **Kutscher,** Marburg — Prof. Dr. **Leo Langstein,** Berlin — Prof. Dr. **Loeb,** Berlin — Prof. Dr. **Jacques Loeb,** Berkeley (Kalifornien) — Prof. Dr. **London,** St. Petersburg — Prof. Dr. **Leonor Michaelis,** Berlin — Prof. Dr. **Franz Müller,** Berlin — Priv.-Doz. Dr. **M. Nierenstein,** Bristol — Prof. Dr. **Osborne,** New-Haven, Conn. — Prof. Dr. **W. Palladin,** St. Petersburg — Geh. Rat Prof. Dr. **E. Pflüger,** Bonn — Dr. phil. **Pringsheim,** Berlin — Prof. Dr. **Röhmann,** Breslau — Dr. phil. und med. **Peter Rona,** Berlin — Prof. Dr. **Rosenfeld,** Breslau — Priv.-Doz. Dr. **Franz Samuely,** Freiburg i. B. — Prof. Dr. **A. Scheunert,** Dresden — Prof. Dr. **Schittenhelm,** Erlangen — Prof. Dr. **J. Schmidt,** Stuttgart — Dr. **Schmitz,** Frankfurt a. M. — Prof. Dr. **Fr. N. Schulz,** Jena — Prof. Dr. **Schulze,** Zürich — Prof. Dr. **Siegfried,** Leipzig — Priv.-Doz. Dr. **Lina Stern,** Genf — Prof. Dr. **Steudel,** Berlin — Hofrat Prof. Dr. **J. Stoklasa,** Prag — Dr. **Eduard Strauß,** Frankfurt a. M. — Prof. Dr. **Tappeiner,** München — Geh. Rat Prof. Dr. **Tollens,** Göttingen — Priv.-Doz. Dr. **Völtz,** Berlin — Priv.-Doz. Dr. **Weiser,** Budapest — **J. Wetzel,** Berlin — Prof. Dr. **Wiechowski,** Prag — Prof. Dr. **Willstätter,** Zürich — Prof. Dr. **E. Winterstein,** Zürich — Priv.-Doz. Dr. **Edgar Zunz,** Brüssel.

HERAUSGEGEBEN VON

**PROF. DR. EMIL ABDERHALDEN,**

DIREKTOR DES PHYSIOL. INSTITUTES DER TIERÄRZTL. HOCHSCHULE, BERLIN.

## DRITTER BAND.

SPEZIELLER TEIL.

MIT 413 TEXTABBILDUNGEN.

## ZWEITE HÄLFTE.

URBAN & SCHWARZENBERG

BERLIN — N., FRIEDRICHSTRASSE 105b

WIEN — I., MAXIMILIANSTRASSE 4

1910.

# Die Blutkörperchenzählung und Hämoglobinbestimmung.

Von **Franz Müller**, Berlin.

## I. Die Fehlerquellen.

### 1. Sedimentieren.

Das Blut stellt eine Suspension, eine Aufschwemmung geformter, den Blutfarbstoff führender Elemente in einer homogenen Flüssigkeit dar. Will man in einem Blutstropfen die Zahl dieser Zellen oder die Menge des Farbstoffs in der Raumeinheit ermitteln und diesen Wert als Ausdruck der Zusammensetzung des in den Gefäßen zirkulierenden Blutes verwerten, so muß man natürlich dafür sorgen, daß der zu untersuchende Blutstropfen sich nicht nach Entfernung aus dem Körper durch Sedimentieren der Blutkörper entmischt, ein Vorgang, der bei Pferdeblut z. B. so störend ist, daß man hier nur unter Anwendung der größten Schnelligkeit brauchbare Vergleichswerte erzielt. Aber auch bei anderen Blutarten tritt dieses Sedimentieren auf und unter gewissen Umständen, z. B. nach vorhergegangenen Aderlässen bei blutarmen Individuen, besonders hochgradig störend in Erscheinung.

So fand *Bürker*[1]) bei Kaninchenblut und sofortigem Abschluß der Zählkammer nach Auftragen des Blutstropfens 0·5—0·9 als mittleren Fehler des Mittelwertes von 6 Zählungen, wenn er nur 1 Minute zwischen Auftragen des Tropfens und Auflegen des Deckglases wartete, schon 1·7—2·6.

Hat man eine größere Menge Blut zur Blutkörperzählung oder Farbstoffbestimmung zur Verfügung, so soll man es in einem recht geräumigen Rundkolben möglichst lebhaft 3—5 Minuten ohne Schaumbildung umschwenken und die Probe dann sofort entnehmen.

### 2. Vasomotorische Störungen.

Voraussetzung für Übertragung der in einem Tropfen Blut gefundenen Werte auf das im Körper zirkulierende Blut ist, daß der Blutstropfen auch in der Tat die gleiche Zusammensetzung wie das in dem zur Entnahme

[1]) *K. Bürker,* Die physiologischen Wirkungen des Höhenklimas. *Pflügers* Archiv. Bd. **105**. S. 480 (1904) und Bd. **107**. S. 426 (1905).

benutzten Blutgefäß zirkulierende Blut besitzt, daß also bei der Entnahme selbst das betreffende Gefäß unverändert bleibt. Eine weitere Voraussetzung ist aber, daß die Blutzusammensetzung in dem betreffenden Blutgefäß zur Zeit der Entnahme der in anderen, großen Gefäßgebieten gleich ist. Über die Schwierigkeiten, die sich bei der Untersuchung der zelligen Elemente des Blutes und des Farbstoffs einstellen können, sagt *Miescher*[1]), zweifellos einer der hervorragendsten Kenner dieser Materie: „Wer sich, sei es an Menschen oder an Tieren, vielfach mit Untersuchungen der Blutbeschaffenheit beschäftigt hat, wird wie wir die Erfahrung gemacht haben, daß allerlei bekannte und unbekannte Umstände hier einwirken und auch ohne jedes Höhenklima uns durch merkliche Veränderungen der Blutkörperchenzahl oder Hämoglobinmenge plötzlich überraschen können. Wir haben ja 3 Angriffspunkte: das Verhältnis der Blutkörper zum Plasma kann durch jede Diarrhöe oder durch Schwitzen und andere Ursachen sich ändern; die Gesetze der Blutregeneration übersehen wir auch noch keineswegs vollständig und vollends ein dunkles Gebiet ist die Intensität der Blutkörperzerstörung und ihre gelegentlichen unberechenbaren Schwankungen, wovon wir auch sonderbare Beispiele beobachtet haben ....“

*a)* Das Verhältnis von Blutkörperzahl zu Plasma in verschiedenen großen Arterien zur gleichen Zeit. Betrachten wir zunächst die Beeinflussung des Verhältnisses von Blutkörperchen und Plasma in großen Blutgefäßen, so zeigten *Cohnstein* und *Zuntz*[2]) durch zahlreiche Versuche an Kaninchen, anschließend an ältere Beobachtungen von *Lesser*, daß die Zahl der Blutkörper in der Volumeinheit des Blutes in allen größeren Gefäßstämmen zur gleichen Zeit nicht nachweisbar verschieden ist. Einige solcher älteren Werte, sowie neuere Versuche, bei denen der Blutfarbstoffgehalt bzw. der Trockenrückstand des Blutes bestimmt wurde, zeigt Tabelle *A* (S. 710).

Auch durch starke Änderungen in der Gefäßweite der Peripherie bleibt die Blutzusammensetzung in den großen Arterien oft fast unbeeinflußt. Das zeigen die folgenden 3 Diagramme[3]), in denen die ausgezogene Linie den Blutdruck, die unterbrochene die Blutkörperzahl im Blut der Art. femoralis, die punktierte den Hämoglobingehalt ebenda anzeigt. Die Injektionen von Suprarenin zwecks Änderung der Gefäßweite in den peripherischen Gefäßgebieten wurden in die Schenkelvene gemacht. Sie sind durch Pfeile angedeutet.

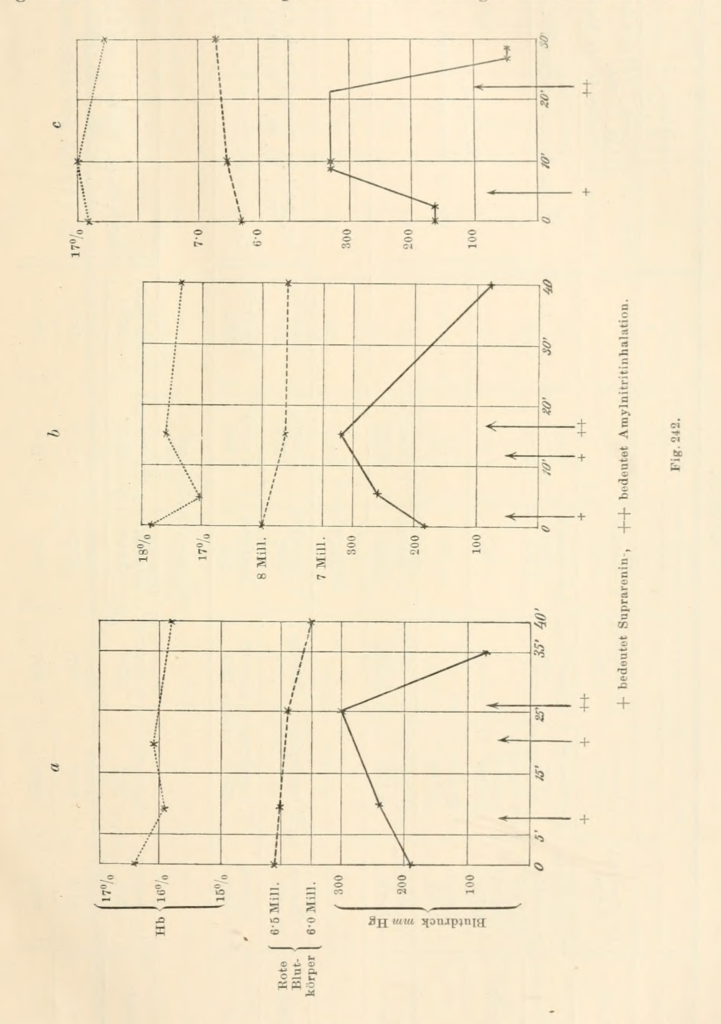
---

[1]) *F. Miescher*, Über die Beziehungen zwischen Meereshöhe und Beschaffenheit des Blutes. Gesammelte Abhandlungen. **1897**. S. 332.

[2]) *I. Cohnstein* und *N. Zuntz*, Untersuchungen über den Flüssigkeitsaustausch zwischen Blut und Geweben unter verschiedenen physikalischen und pathologischen Bedingungen. *Pflügers* Arch. Bd. **42**. S. 303 (1888).

[3]) *O. Hess*, Über die Beeinflussung des Flüssigkeitsaustausches zwischen Blut und Geweben durch Schwankungen des Blutdrucks. Deutsch. Arch. d. klin. Med. Bd. **79**. S. 128 (1903). — *W. Erb jun.*, Über den Einfluß von Blutdruckschwankungen auf die Konzentration des arteriellen und venösen Blutes. Deutsch. Arch. d. klin. Med. Bd. **88**. S. 36 (1907).

Andrerseits können erhebliche Änderungen in der Weite großer Kapillargebiete indirekt die Blutkörperchenzahl in den großen Gefäßstämmen be-




+ bedeutet Suprarenin-, ++ bedeutet Amylnitritinhalation.

Fig. 242.

einflussen. So fanden *Cohnstein* und *Zuntz* bei einem Hund mit durchschnittenem Brustmark in der Art. femoralis 4·2, 2 Stunden später nach

Tabelle *A*.

| Tierart | Zahl der Erythrocyten in Blutprobe in Millionen | | | | | | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| Hund | Art. femoral. 5·290 | V. femoral. 5·200 | Art. femoral. 5·200 | V. femoral. 5·150 | | | *Cohnstein* und *Zuntz*, *Pflügers* Arch. Bd. **42**. S. 305. Zwischen den Proben je 10′ Pause. |
| " | V. prof. fem. 5·235 | Art. femoral. 5·385 | V. prof. fem. 5·230 | Art. femoral. 5·400 | | | Dieselben. Proben kurz nacheinander. |
| Kaninchen | Ast der V. femoral. 5·500 | Ast der Art. femoral. 5·540 | | | | | Dieselben. Proben kurz nacheinander. |
| " | Ebenso 5·200 | Ebenso 5·240 | | | | | |
| " | V. femoral. 5·000 | Art. circ. ilei 5·173 | Art. circ. ilei 5·168 | V. femoral. 5·042 | V. femoral. 5·000 | | |
| | | | Hämoglobin %. | | | | |
| Hund | Carotis 11·3 | V. jugularis 11·0 | Carotis 10·6 | V. jugularis 10·6 | Carotis 10·4 | Jugularis 10·1 | *W. Erb jun.*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 88. S. 36 (1901). Zwischen je 2 Proben $^1/_2$—1′ Pause. |
| " | Carotis 15·2 | V. jugularis 14·7 | Carotis 15·1 | Jugularis 14·7 | Carotis 15·5 | Jugularis 16·2 | |
| | | | Trockenrückstand. | | | | |
| Hund | Art. femoral. 20·6 | Jugularis 20·9 | Art. femoral. 23·5 | Jugularis 22·9 | Art. femoral. 21·3 | Jugularis 21·3 | *W. Erb jun.*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 88. S. 36 (1901). Je 2 Proben kurz nacheinander. |
| " | Ebenso 21·8 | Ebenso 21·8 | Ebenso 23·8 | Ebenso 23·3 | Ebenso 21·3 | Ebenso 21·5 | |
| | 19·9 | 19·9 | 20·7 | 20·8 | 20·2 | 20·0 | |

## Tabelle *B.*

| Ort der Entnahme der ersten Blutprobe | Ort der Entnahme der zweiten Blutprobe | Zahl der roten Blutkörperchen in der ersten Blutprobe (Millionen) | Zahl der roten Blutkörperchen in der zweiten Blutprobe (Millionen) | Die zweite Blutprobe wurde wie lange nach der ersten entnommen | Abweichung vom Mittel in Prozent des Mittelwertes | Zitiert nach Autor, Ort | Tier Nr. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Kaninchen. | | | | |
| Kleine Hautvenen in Leiste, bzw. Muskel | Kleine Arterie des Wirbelkanals | 5·253<br>5·258 | 4·956 | 1h 5′ | 2·9 | *Cohnstein* und *Zuntz*, *Pflügers* Archiv. Bd. 42 (1888) | VIII |
| Kleine Arterie des Wirbelkanals | Ebenda Tier aus Narkose erwacht | 4·956 | 5·455 | 12′ | 4·8 | | VIII |
| Ohrvene, Äthernarkose T. 36·8° | Ohrvene, erwacht T. 37·8° | 5·050 | 5·312 | 29′ | 2·5 | | IX |
| Ohrvene, ruhig sitzend | Ohrvene, aufgebunden | 5·287 | 5·095 | 11′ | 1·8 | | XI |
| Ohrvene, ruhig sitzend | Ohrvene, aufgebunden | 5·490 | 5·340 | 30′ | 1·4 | | XVI |
| Ohrvene, T. 39·6° | Ohrvene, T. 40·2° und 40·7° (Ohren kalt) | 5·133 | 4·808<br>4·897 | 1h 7′ bzw. 5h | 2·8 | | XXXVII |
| Ohrvene, Tier kommt aus der Kälte freisitzend | Ohrvene, aufgebunden seit 40′ | 5·385 | 4·700 | 55′ | 6·0 | | XLI |
| Ohrvene, freisitzend | Ohrvene, aufgebunden | 5·267 | 4·542 | 23′ | 7·2 | | XLI |
| Ohrvene, aufgebunden | Ohrvene, freisitzend | 4·542 | 5·232 | 10′ | 6·9 | | XXXXI |
| | | | Hunde. | | | | |
| | | Hb-% I. | Hb-% II. | | | | |
| Ohrvene | Carotis | 8·6 | 8·6 | höchstens 5′ | 0 | *Franz Müller*, *Virchows* Archiv. Bd. 164 (1901) | Gelb |
| Ohrvene | Carotis | 8·66 | 6·88 | | 11·5 | | Schwarz |
| Ohrvene | A. femoralis | 10·29 | 8·96 | | 7 | | Schwarz, weiß |
| Ohrvene | Carotis | 8·13 | 7·14 | | 6·5 | | Gelb |
| Ohrvene | Carotis | 11·47 | 10·12 | | 6·2 | | Schwarz, weiß |

Rückenmarkreizung und heftigem Beintetanus 5·0, $1^1/_2$ Stunden danach in Ruhe 3·7 Millionen roter Blutkörper.

*b)* Das Verhältnis von Blutkörperchen zu Plasma im Venengebiet zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Kapillaren führen oft blutkörperchenärmeres Blut als die großen Gefäßstämme. Der relative Gehalt an Blutkörperchen im Verhältnis zum Plasma wechselt stark mit der Weite der Kapillaren und der Geschwindigkeit des Blutstromes. So haben alle diejenigen Eingriffe, welche die Weite und die Strömung in größeren Kapillargebieten ändern, Einfluß auf die Blutkörperchenzahl im Venen blut. *Cohnstein* und *Zuntz* studierten von derartigen Faktoren: Durchschneidung und Reizung des Rückenmarks, Vagusreizung, Erhöhung des Venendruckes, die Muskeltätigkeit und das Fieber. Die Erregung des Tieres, die Fesselung und Narkose, überhaupt alle die die Vasomotorentätigkeit beeinflussenden Vorgänge verändern durch ihren Einfluß auf die Blutströmung in der Peripherie die Zusammensetzung des Blutes der venösen Gebiete. Als Beispiel für derartige Beeinflussungen sei die vorstehende Tabelle *B* gegeben, in der sich neben den älteren einige neuere eigene Versuche finden. Die erlaubte Abweichung von 2 Parallelbestimmungen der Blutkörperzahl beträgt etwa 1·5% in Maximo, d. h. 75.000 auf 5 Millionen.

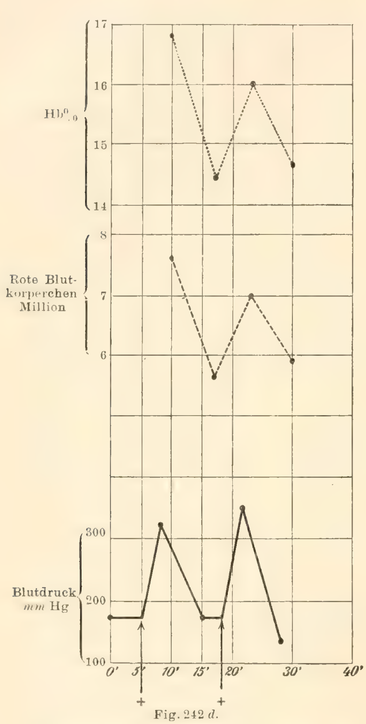


Fig. 242 *d.*

+ Suprarenin-Atropin-Injektion in V. femoralis.

Ein Beispiel, wie selbst sehr kleine Zeitdifferenzen zwischen der Entnahme zweier unter verschiedenen Umständen gewonnener Venenblutproben die Resultate fälschen können, bietet die Fig. 242 *d.*

In ihm sind die Blutkörperzahl und die Hämoglobinmengen des Blutes der Vena jugularis bei starken Blutdruckschwankungen verzeichnet. Man sollte danach annehmen, daß sich die Zusammensetzung des Venen-

blutes im Gegensatz zu der des Arterienblutes (siehe Fig. 242) stets gleichsinnig mit Änderungen des Blutdrucks ändert. Diese Tatsache würde zu sehr merkwürdigen Schlüssen über die Funktion der Lunge als Ausgleichsorgan der Blutzusammensetzung führen. Trotzdem aber die Fig. 242*d* zugrunde liegenden Bestimmungen selbst tadellos und einwandfrei gemacht waren, liegt doch ein Fehler vor. Die Entnahme des Venenblutes erfolgte nämlich immer, wie in Fig. 242*d* angedeutet, kurz nach der Blutdruckmessung und nach Blutentnahme aus der Arterie und man sieht die starken Divergenzen zwischen Arterien- und Venenblut auch nur, wenn man zuvor Arterienblut und etwa 30″ oder noch später, während der Blutdruck inzwischen erheblich geringer oder gefallen ist, das Venenblut entnimmt. Verfährt man aber umgekehrt und nimmt nach der Blutdruckänderung zuerst Venen-, dann Arterienblut oder beide Proben genau gleichzeitig, so fällt (siehe Tabelle *A*) der Unterschied fort.[1])

Wollen wir also bei akut wirkenden Eingriffen durch Zählung der Blutkörper oder Bestimmung des Farbstoffs die Blutzusammensetzung in verschiedenen Gefäßgebieten zu gleicher Zeit oder im peripherischen Gefäß zu verschiedenen Zeiten vergleichsweise ermitteln, so müssen wir die Proben im ersten Fall genau gleichzeitig entnehmen und im zweiten dafür sorgen, daß die Blutverteilung keine erheblichen Änderungen erlitten hat, eine Forderung, die bei gefesselten Tieren infolge des Sträubens sehr schwer, bei Menschen nur nach längerer Einübung zu erzielen ist. Bei der Untersuchung von Tierblut gelangt man, wie gesagt, zu sichereren Resultaten, wenn man Blut aus größeren Gefäßstämmen benutzt. (Vgl. Tabelle *A*.) Man muß außerdem sicher sein, daß die Tiere sich in normalem Körperzustand befinden, denn Krankheiten irgendwelcher Art, besonders die bei Versuchstieren häufigen Infektionskrankheiten können die Resultate infolge der dadurch veränderten Blutverteilung vollkommen unbrauchbar machen.

Ferner muß Änderung der lokalen Blutfülle durch Drücken und Massieren des Hautgebietes, aus dem beim Menschen etwa eine Blutprobe zur Untersuchung entnommen werden soll, vermieden werden: Man muß mit einem festen Lanzettenstich[2]) in die Fingerspitze oder ins Ohrläppchen einstechen, so daß das Blut im großen Tropfen sofort ohne Quetschen oder Reiben der Haut hervorquillt. Der erste Tropfen wird trocken abgewischt oder abtropfen gelassen. Der zweite Tropfen wird von dem einige Zeit

---

[1]) In einer unter *Ashers* Leitung gemachten Arbeit (*Bruno Böhm*, Fortgesetzte Untersuchungen über die Permeabilität der Gefäßwände. Biochem. Zeitschr. Bd. 16. S. 315. 1909) ist der Einfluß der durch Splanchnikusreizung oder Adrenalininjektion hervorgebrachten Blutdrucksteigerung auf den Trockensubstanzgehalt des Arterien- oder Venenblutes in den Bauchorganen neuerdings untersucht worden. Nach der dort geäußerten Ansicht können mechanische Druckschwankungen innerhalb der physiologischen Grenzen den Flüssigkeitsaustausch zwischen Blut und Geweben nicht beeinflussen. Adrenalin wirke durch besondere Beeinflussung der Gefäßwände.

[2]) Die Lanzette des „*Franke*schen Schnäppers" soll unten halbrund sein, nicht spitz, da dann mehr Blut fließt, sie fährt 1—2 *mm* durch Federdruck hervor.

zuvor gut gereinigten Hautteil in den Meßapparat aufgesogen oder sonstwie zur Untersuchung gebracht.

## II. Die Blutkörperchenzählung.

Der allein heute noch gebräuchliche Apparat ist der sogenannte *Thoma-Zeiss*sche Zählapparat[1] (Fig. 243). Er besteht aus einem Melangeur oder einer Mischpipette, die wohl zuerst von *Potain* angegeben ist, und einer Zählkammer. Die Mischpipette besitzt eine in eine birnförmige Erweiterung *E* übergehende und in ein enges, nicht ganz kapillares kurzes Rohr auslaufende Kapillare *S*. An dem Endstück wird ein Gummischlauch mit Mundstück *M* angesetzt. Die Kapillare trägt entweder nur 2 Marken (0·5 und 1·0) oder besser nach den Angaben von *Miescher*[2]) neben den zur Vermeidung der parallaktischen Verschiebung rund herum geteilten Ringmarken 0·5 und 1·0 je zwei kleinere Striche als Hilfen bei nicht ganz genauer Auf-

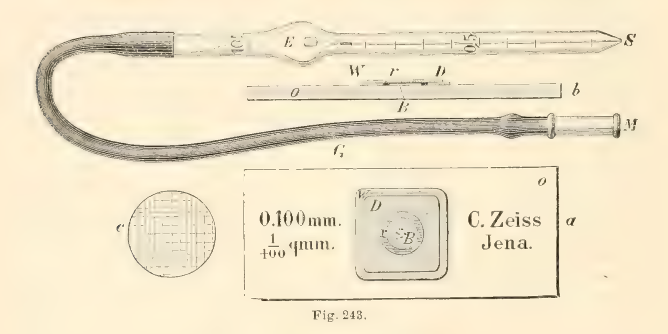



Fig. 243.

saugung des Blutes. Jeder dieser kleinen Abschnitte zwischen Hauptteilstrich und Hilfsstrich entspricht genau einem Hundertstel des gesamten Volumens der Kapillare. An dem oberen Ende der birnförmigen Erweiterung befindet sich eine dritte große Marke 101. Der Apparat ist so hergestellt, daß der Inhalt der Kapillare bis zum Teilstrich 1 genau den hundertsten Teil des Inhaltes der Birne darstellt, bis 0·5 dementspechend den zweihundertsten Teil. In die Kugel ist eine Glasperle frei beweglich eingeschmolzen.

Man nimmt die Verdünnung des Blutes in der Weise vor, daß man das Blut vom Ohrläppchen bis zu einer der Marken in die Kapillare aufsaugt, darauf das konisch zugeschliffene polierte Ende der Kapillare mit Filtrierpapier oder japanischem Papier (ohne Fäserchen, schneiden nicht

[1]) *J. F. Lyon* und *R. Thoma,* Über die Methode der Blutkörperzählung. *Virchows* Archiv. Bd. **84**. S. 131 (1881).

[2]) *F. Miescher*, Bemerkungen über eine verbesserte Form der Mischpipette. Korrespondenzblatt für Schweizer Ärzte. Bd. **23**. S. 830 (1893).

reißen!) blutfrei abwischt und nun eine die Blutkörperchen nicht verändernde Verdünnungslösung bis zur Marke 101 nachsaugt. Dabei muß der Eintritt von Luftbläschen vermieden werden. Sobald man eingesaugt hat, verschließt man das zugespitzte Ende mit dem zweiten Finger, das obere Ende mit dem Daumen und schüttelt so lange, bis die Lösung gleichmäßig durchgemischt erscheint. Das Aufsaugen der Verdünnungslösung muß natürlich so schnell erfolgen, daß das Blut in der Kapillare nicht gerinnt.

Als Konservierungsflüssigkeit der roten Blutkörperchen sind zahlreiche Gemische empfohlen worden, von denen hier nur die empfehlenswerteste, die *Hayem*sche Lösung, genannt sei.

| | | |
|---|---|---|
| Rezept: | Hydrarg. bichlor. . . . . . . . | 0·5 |
| | Natr. sulfur. . . . . . . . . . | 5·0 |
| | Natr. chlorat. . . . . . . . . | 1·0 |
| | Aqu. dest. . . . . . . . . . . | 200·0 |

Zur Zählung der weißen Blutkörperchen benutzt man Verdünnungsflüssigkeiten, die die roten lösen und die weißen konservieren, so nach *Thoma* 0·3—0·5%ige Essigsäure, eventuell unter Zusatz einer geringen Menge eines die Leukozyten färbenden Farbstoffs.

In diesen Lösungen halten sich die roten bzw. weißen Blutkörperchen oft 24 Stunden, es empfiehlt sich aber doch, die Zählung noch am Tage der Entnahme vorzunehmen.

Zur Zählung der Blutplättchen hat man je 10 Teile von 0·1%iger Chromsäure und 1%iger Osmiumsäure mit einem Teil Eisessig vorgeschlagen. *Bürker* empfiehlt Auftropfenlassen von Blut auf Paraffin, Abheben der Plättchen von der Kuppe des Tropfens. Die Zählung der Blutplättchen muß schnell erfolgen, da sie weniger haltbar sind als die anderen Blutbestandteile.[1])

Die Zählkammer des *Thoma-Zeiß*schen Apparates besteht aus einem auf einem Objektträger aufgekitteten Glasrahmen *W* mit zentralem kreisförmigen Ausschnitt *r*. In dem Ausschnitt sitzt ein rundes Glastischchen *B*, in welches in der Mitte ein Netz kleinerer und größerer Quadrate eingeritzt ist. Der äußere Glasrahmen *W* überragt die Höhe des inneren Glastischchens *B* genau um 0·1 *mm* (Fig. 243).

Man hat nun einen Tropfen der Blutmischung (und zwar nicht den ersten, der sich in der Kapillare befindet und nicht mitgemischt worden ist) auf die Mitte des Glastischchens zu bringen und sofort ein dickes Deckglas *D* von der Seite her so überzuschieben, daß der kreisrunde Rand des Rahmens der gefüllten Zählkammer *Newton*sche Farbenringe zeigt. Dies gelingt nur nach einiger Übung. Hat man etwas zu viel Flüssigkeit, so tritt sie über das Deckglas und muß durch Filtrierpapier entfernt werden. Hat man zu wenig oder das Deckglas schief aufgeschoben, so befinden sich Luftblasen in der Zählkammer. In diesem Fall muß man von neuem reinigen und wieder füllen.

[1]) *K. Bürker*, Blutplättchen und Blutgerinnung. *Pflügers* Archiv. Bd. **102**. S. 36 (1904). S. 92 Konservierung der Blutplättchen.

Um die korrekte Füllung, von der die Höhe des mit Blut erfüllten Raumes und daher die Richtigkeit der Zählung abhängt, zu erleichtern, hat *Bürker*[1]) eine Modifikation der Zählkammer empfohlen, bei der das Deckglas vor der Füllung aufgeschoben und die Blutmischung dann in 2 Zählkammern durchgesaugt wird (Fig. 244). Auf diese Weise wird eine Doppelbestimmung ohne Neufüllung ermöglicht und die doch noch sehr leicht eintretende ungleichmäßige Verteilung der Zellen verhindert. Die eingeritzte Quadratur fehlt entweder und dafür wird ein mit Quadratteilung versehener Objektmikrometer benutzt, da *Bürker* fürchtete, die Zellen könnten an den wie Gräben wirkenden Strichen liegen bleiben und die Gleichmäßigkeit der Zellverteilung beeinträchtigen, oder beide Zählflächen sind in der beifolgenden Art geteilt (Fig. 245 *a*, *b*).

Wenn auch das Überschieben des Deckglases, wie erwähnt, sofort nach Aufbringen der Blutmischung geschieht, wird doch oft eine an Körperchen reichere Flüssigkeit in der Mitte der Kammer, eine zellärmere an den Rändern gefunden. Die mikrophotographischen Aufnahmen *Bürkers*

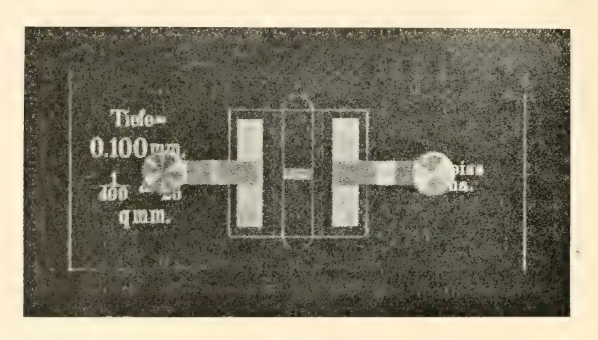



Fig. 244.

zeigten, wie ungleich auch bei korrektem Vorgehen oft die Verteilung in der älteren *Thoma*schen Kammer erfolgt. Es soll also nach Einstellung unter dem Mikroskop bei etwa 400facher Vergrößerung das Gesichtsfeld gleichmäßig mit Blutkörperchen erfüllte Quadrate zeigen.

Man zählt bei der alten Kammer 100 Quadrate mit etwa 1000 Zellen. Da die Seitenlänge jedes Quadrates $^1/_{20}$ *mm*, sein Flächeninhalt also $^1/_{400}$ $mm^2$, die Höhe 0·1 *mm*, sein Rauminhalt also $^1/_{4000}$ $mm^3$ beträgt, so muß man, um die Menge Blutzellen im Kubikmillimeter Blut zu finden, die gefundene Zahl mit 4000 und der Verdünnung des Blutes (100 bzw. 200) multiplizieren und durch die Zahl der gezählten Quadrate dividieren. So erhielten *Lion* und *Thoma*[2]) bei Kontrollversuchen an de-

[1]) l. c.

[2]) l. c.; ferner *Reiner*, Die Zählung der Blutkörperchen und ihre Bedeutung für Diagnose und Therapie. Leipzig 1891.

fibriniertem Schweineblut bei Reihen von 12—24 Füllungen mit je 900 bis 1150 gezählten Zellen (100 Quadrate, Verdünnung $^1/_{200}$) einen wahrscheinlichen Fehler von im ersten Falle 2·7, im zweiten Falle 1·8%. *Veillon* bekam in 12 Füllungen mit Schweineblut bei Zählung von je etwa 1100 Zellen als größte Abweichung vom Mittel 0·89% des Mittelwertes, als wahrscheinlichen Fehler 0·38%. *Brünings*[1]) erzielte in Serien von je 5 Zählungen von 400 Quadraten Abweichungen von + 1·4 bis —1·7% vom Mittelwert.

*Bürker* bekam in seiner neuen Kammer bei Zählung von je 40, also nur 80 Quadraten einen mittleren Fehler von ± 0·6% des Mittelwertes. (Man zählt in *Bürkers* Kammer die roten Blutkörperchen in den kleinen, die weißen in den großen Quadraten des Netzes.)

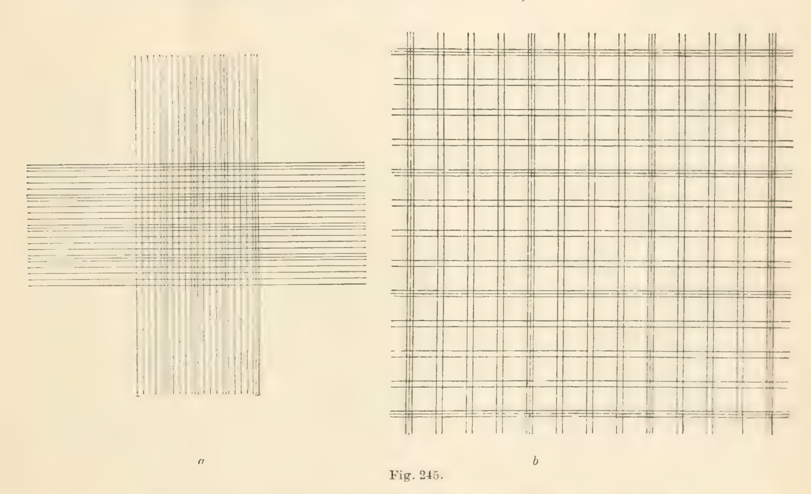



Fig. 245.

Man sieht also, daß die aus fehlerhafter Füllung der Pipette und fehlerhafter Herstellung des Präparates sich ergebenden Fehler bei großer Übung(!) recht gering sind. Die durch fehlerhafte Konstruktion der Apparate bedingten Fehler sind, wie eingehende Vergleiche verschiedener *Zeiß*scher Apparate gezeigt haben, ganz unwesentlich. Die Abweichung betrug *(Thoma)* bei Zählung von etwa 12.000 Zellen zwischen zwei Apparaten 0·9%, bei Zählung von 61.000 Zellen nur 0·3%.

Die lange ventilierte Frage, ob die Zählkammer ihre Höhe bei verschieden hohem äußeren Luftdruck ändere, ist heute bestimmt in negativem Sinne entschieden. So erhielt *Abderhalden* in der geschlossenen

---

[1]) *W. Brünings*, Ein neuer Apparat zur Blutkörperchenzählung. *Pflügers* Archiv. Bd. **93**. S. 406 (1903).

*Thoma-Zeiß*-Kammer wie in der nach außen offenen Schlitzkammer genau die gleichen Zahlen:

Tabelle *C*.

| Nr. | Millionen Alte Kammer | Schlitzkammer |
|---|---|---|
| II 2 . . . | 5·405 | 5·403 |
| „ . . . | 5·409 | 5·411 |
| „ . . . | 5·415 | 5·414 |
| V 2 . . . | 5·579 | 5·582 |
| „ . . . | 5·581 | 5·578 |
| VI 2 . . . | 4·908 | 4·907 |
| „ . . . | 4·911 | 4·915 |
| „ . . . | 4·905 | 4·909 |
| VII 7 . . . | 5·119 | 5·202 |
| „ . . . | 5·208 | 5·204 |
| VIII 1 . . . | 5·281 | 5·285 |
| „ . . . | 5·288 | 5·291 |

*Bürker* stellte auf optischem Wege, durch Beobachtung der *Newton*schen Ringe, die Unabhängigkeit vom äußeren Luftdruck fest. Nur bei sehr rasch eintretender Luftverdünnung im pneumatischen Kabinett fand er eine geringe Abnahme der Kammerhöhe. Auch Temperaturunterschiede zwischen 24—45° sind praktisch für die Kammerhöhe ohne Bedeutung (+0·0003 *mm*).

Die oben genannten Kontrollversuche mit 0·6 bis etwa 2% maximaler Abweichung bedeuten also bei der üblichen Normalzahl von 5 Millionen roter Blutkörperchen in 1 $mm^3$ 30.000—100.000 Zellen als zu vernachlässigende Differenz. Meistens wird man bei einem nicht so geübten Untersucher mit 4mal so großen Abweichungen zu rechnen haben. Man wird nach obigem also meist Differenzen bis zu etwa 180.000 bei einer Blutkörperchenmenge von 5 Millionen als innerhalb der Fehlergrenzen liegend zu betrachten haben. Natürlich ist es ein Unfug, mehr als höchstens 4 Zahlen anzugeben. Man sollte sich daher gewöhnen, 5 Millionen, 5·5, 5·18 usw., nicht 5.500.000, 5,180.000 zu schreiben, wie es noch meist geschieht. Nur wenige sehr Geübte werden Differenzen unter 1% als reell ansehen dürfen.

Für die Zählung der weißen Blutkörperchen findet sich in dem *Thoma-Zeiß*schen Apparat eine zweite Mischpipette, bei der die Verdünnung 1:10 bzw. 1:20 beträgt. Hier ist das Resultat also dementsprechend mit 10 bzw. 20 statt 100 oder 200 zu multiplizieren.[1])

Sehr empfehlenswert erscheint mir *Bürkers* Rat, die Zählbefunde in gedruckte Schemata einzutragen, die Quadrate in der Reihenfolge der Netzteilung enthalten. (Buchdruckerei H. Laupp jun., Tübingen, Heubergerstraße Nr. 1—3.) So bietet das Zählresultat auf den ersten Blick ein Bild der Verteilung der Zellen und man zählt nicht so leicht ein Quadrat doppelt.

[1]) Eine prinzipiell andersartige Zählmethode, bei der das Blut in $\frac{n}{10}$-HCl verdünnt und in gefärbtem Trockenpräparat gezählt wird, empfehlen *V. Ellermann* und *A. Erlandsen*, Eine neue Technik der Leukozytenzählung. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 98. S. 245 (1909). Der Fehler soll relativ klein sein.

## III. Die Bestimmung des Blutfarbstoffs.

Die roten Blutkörperchen sind bei höheren Tieren die einzigen Blutelemente, die roten Blutfarbstoff, Hämoglobin, enthalten. Will man den Hämoglobingehalt im Kubikzentimeter Blut ermitteln, so muß man die roten Blutzellen auflösen und das Hämoglobin austreten lassen.

Die Bestimmung der Farbintensität einer solchen Blutlösung geschieht nach denselben Prinzipien, nach denen auch sonst kolorimetrische Vergleiche angestellt werden, nur bedingt die nicht unbegrenzte Haltbarkeit sowie die je nach der Gassättigung leicht wechselnde Farbennuance der verdünnten Blutlösung bestimmte Vorsichtsmaßregeln.

### Allgemeine Bemerkungen.

Den meisten Untersuchern ist es erwünscht, ihr Auge vor Nebenlicht zu schützen und nur das die Blutfarbstofflösung passierende rötliche Licht auf die Netzhaut wirken zu lassen. Man wird daher, wenn möglich, im Dunkelzimmer arbeiten oder einen Mikroskopierkasten benutzen. Einfacher ist eine aus geschwärzter Pappe hergestellte Röhre, in der sich Öffnungen für die beiden Augen befinden.

Man hat störende Reflexe von der Oberfläche der Farbstofflösung oder von den Glasteilen des Apparates zu vermeiden. Weiter müssen sowohl die abschließenden Glasflächen, welche das Licht passiert, wie die zu untersuchende Lösung selbst absolut staub-, fett- und gerinnselfrei sein, und Luftblasen selbstverständlich fehlen. Es ist bekannt, wie selbst für das bloße Auge nicht sofort merkliche Trübungen die Absorptionskraft einer Lösung außerordentlich stark verändern. Die Glasteile sind daher mit nicht fasernden, weichen Tüchern zu reinigen, da Schrammen im Glas den Gang der Lichtstrahlen ablenken. Die zu untersuchende Lösung muß vor dem Einfüllen filtriert werden.

Endlich darf die Blutlösung nach Herstellung der erforderlichen Verdünnung nicht längere Zeit aufgehoben werden: Im allgemeinen verändert **unverdünntes** defibriniertes Blut auf Eis aufbewahrt seine Färbekraft im Laufe von 24 Stunden nicht, wenn man es kurz vor dem Versuch mit Luft kräftig schüttelt. Doch kommen auch Ausnahmen vor. Hundertfach verdünntes Blut dagegen liefert oft schon nach wenigen Stunden abnorme Zahlen. Es ist sehr zu beachten, daß die mit dem Blut in Berührung kommenden Glasgefäße, die ja trocken sein müssen, nicht durch Äther getrocknet werden, da der im Laboratorium verwendete gewöhnliche Äther meist beim Verdunsten etwas Rückstand hinterläßt und auch ohnedies nicht ganz frei ist von kleinen Mengen von Substanzen, die das Hämoglobin in Methämoglobin verwandeln und damit die Absorptionskraft wie den Farbenton der Blutlösung stark ändern. Man hat häufig genug beobachtet, wie Blut, das in mit äthergetrockneten Glasgefäßen aufbewahrt

war, auch ohne verdünnt zu sein, nach wenigen Stunden nennenswerte Mengen von Methämoglobin aufwies.

**Die einzelnen Hämoglobin-Bestimmungsapparate, Hämometer** lassen sich in solche einteilen, bei denen ein Vergleich mit einer Farbe oder Farblösung stattfindet, sodann in solche, bei denen das Licht gleichzeitig die Blutfarbstofflösung und reines Wasser passiert, unter dem sich eine gefärbte Schicht von verschiedener Dicke befindet. Im folgenden sollen nur die zurzeit empfehlenswertesten und die viel gebrauchten Apparate beschrieben werden. Es gibt aber erheblich mehr. Schon 1897 wurden 22 verschiedene Ausführungen gezählt.

*A.* Einfachere Apparate für die Bedürfnisse der Praxis.

1. Farbenvergleichung nach *Ehrlich-Tallqvist.*[1])

*Ehrlich* empfahl, zur ungefähren Schätzung der Färbestärke einen Blutstropfen von 5—6 *mm* Durchmesser langsam von reinweißem, nicht zu

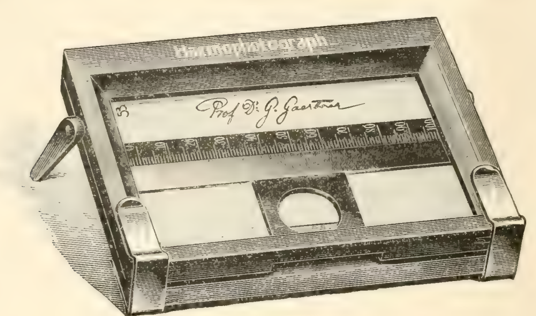



Fig. 246.

rauhem Filtrierpapier aufsaugen zu lassen und bei auffallendem Licht mit normalem Blut oder einer Farbenskala zu vergleichen. *Tallqvist* hat dann eine Farbenskala[2]) herstellen lassen. Eine derartige Vergleichung kann natürlich nicht sehr genau sein, aber sie genügt oft zur ungefähren Orientierung. In 100 Messungen fand *Zur Verth* 19mal unter 5%, 42mal 5%, 34mal 10%, 5mal 15% Abweichung von den Werten, die der *Fleischl-Miescher*sche Hämometer lieferte.

2. *Gärtner*scher Hämophotograph[3]) (Fig. 246).

[1]) *Ehrlich-Tallqvist,* Einfaches Verfahren zur Schätzung der Färbestärke des Blutes. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **40**. S. 137. — *Zur Verth,* Über Bestimmungen des Hämoglobingehalts mit der *Tallqvist*schen Skala. Münchener med. Wochenschr. Bd. **51**. S. 1338 (1904).

[2]) Erhältlich bei Wentzel Hagelstamms Verlag, Helsingfors.

[3]) *G. Gärtner,* Neuer Apparat zur Bestimmung des Hämoglobingehalts im Blute. Münchener med. Wochenschr. Bd. **48**. S. 2003 (1901).

Es ist unter Umständen erwünscht, die Vergleichung mit einem sogenannten Normalblut oder einer Normallösung, wie es die meisten Methoden verlangen, sowie die Farbenvergleichung durch das oft farbenunempfindliche oder abnorm empfindende Auge zu umgehen. Denn es muß zugegeben werden, daß viele Vergleichslösungen teils ihre Färbung beim Aufbewahren verändern, teils nur selten genau die Blutfarbennuance in den verschiedensten Verdünnungen besitzen. Aus diesem Grunde empfiehlt *Gärtner* an Stelle der direkten Beobachtung die Prüfung der Absorption der chemisch wirksamen Sonnenstrahlen durch eine Blutlösung in ihrer Wirkung auf untergelegtes photographisches Papier. Die Schwärzung des Papiers wird verglichen mit der Absorption durch einen künstlich hergestellten Glaskeil von zunehmender Schwärzung.

Im einzelnen besteht der Apparat aus einem kleinen photographischen Kopierrahmen (Fig. 246), in dem eine Skala neben einem mit rundem Ausschnitt versehenen kleinen Rahmen befestigt wird. In dem Kreisausschnitt des Rahmens sitzt eine etwa 2 *mm* hohe Glaskammer, die mit der Blutlösung gefüllt und oben durch eine überzuschiebende Glasplatte verschlossen wird. Zur Vornahme der Untersuchung legt man in den Kopierrahmen ein photographisches Papier und exponiert so lange, bis das Papier unter der Blutlösung denselben Farbenton angenommen hat, wie

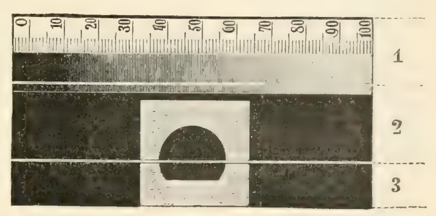


Fig. 247.

ein in dem Rahmen befindlicher, mit unveränderlicher Ölfarbe angestrichener, grauschwarzer Streifen. (Durch Ausprobieren wurde gefunden, daß dann das Optimum der Genauigkeit erreicht ist.) Die Exposition dauert bei gutem Licht 2—3, bei schlechtem Licht 10—12 Minuten für normales Blut. Nach beendeter Belichtung wird der Rahmen geöffnet und das Papier herausgenommen (Fig. 247). Man sieht die Millimeterskala, das Bild des Keils und von einem quadratischen weißen Feld eingerahmt das kreisförmige Bild der Blutkammer. Zur Bestimmung, welche Punkte des Keils dem Blutbild im Ton am meisten gleichen, muß man die Teile unmittelbar nebeneinander haben. Man schneidet daher das Papier in der in Fig. 247 angegebenen Weise in 3 Teile und legt nun Teil *3* neben *1* unter einen in Fig. 248 abgebildeten, mit einer Blendenöffnung versehenen Karton. Durch Auf- und Abwärtsschieben des Keilbildes findet man den Punkt der Farbengleichheit. Natürlich muß die Bestimmung, da das Papier nicht fixiert ist, schnell und in schwach diffusem Licht gemacht werden, am besten bei künstlichem Licht (Glühlampen oder Petroleum, nicht Auerlicht) resp. weiter als 1 *m* von der helleren Lichtquelle entfernt. Die Vergleichung ist nach wenigen Sekunden geschehen und läßt sich beliebig oft wiederholen

Sollte das Papier sich inzwischen verändert haben, so schneidet man eine neue Stelle aus Stück *2* heraus und nimmt die Vergleichung von neuem mit einem frisch abgeschnittenen, im Dunkeln bewahrten Stück der Skala vor.

Will man das Bild als Dokument aufbewahren, so muß man die fixierte Kopie wie oben zerschneiden. Abschnitt *2* um 180° gedreht neben *1* aufkleben, wie es zur Ablesung erforderlich ist. Natürlich muß darauf geachtet werden, daß Ton- und Fixierbad die beiden Hälften genau in der gleichen Weise treffen und beeinflussen. Die Genauigkeit ist beim fixierten Bild nicht so groß wie beim unfixierten. Es wird daher empfohlen, die Messung am nichtfixierten Bild vorzunehmen und ein anderes Blatt zu kopieren, zu fixieren und aufzuheben.

Gerade bei dieser Bestimmung hat sich gezeigt, daß verdünnte Blutlösungen sich außerordentlich schnell in ihrer Absorptionskraft verändern. Schon nach einer halben, ja bei Belichtung nach einer Viertelstunde kann man Abweichungen konstatieren. Man kann daher nicht, um die Konstanz der Angaben des Apparates zu prüfen, dieselbe Blutprobe wiederholt kopieren, man muß vielmehr in diesem Falle eine neue Probe desselben Blutes verdünnen. Die Skala ist so hergestellt, daß der Hämoglobingehalt des normalen Blutes mit 100 bezeichnet wird. Sie reicht nur bis 20% herab, da niederere Werte nicht mehr gut abzulesen sind. Wenn man also bei nicht zu anämischem Blut 1 $cm^3$ des Blutes mit 2 $cm^3$ Wasser verdünnt, so hat man hier gleiche Mengen zur Verdünnung zu wählen. 1 *mm* der Skala entspricht bei höheren Hämoglobinwerten bis zu 5%, bei den niedrigen meist 1%. Als Abmessungsvorrichtung wird eine Blutpipette mit polierter Spitze und Ringmarke nach *Miescher*schen Vorschriften (siehe Blutkörperchenzählung, S. 714) beigegeben. Das Abmessen des Wassers zur Verdünnung geschieht durch Pipettieren.[1] Über die Genauigkeitsgrenze des Apparates ist anscheinend noch nichts veröffentlicht worden.

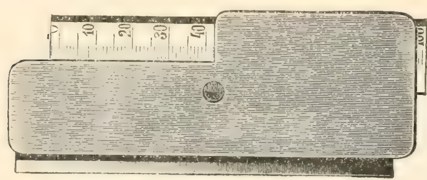


Fig. 248.

3. *P. Grützner*[2]) war von der Farbenvergleichung nach *Tallqvist* sehr wenig befriedigt und hat einen anderen einfachen Hämometer empfohlen.[3])

Der Keilhämometer: Der Apparat besteht aus einem oben 1·7 *cm* tiefen und etwa 7 *mm* breiten Glaskeil von etwa 5·2 *cm* Höhe. Der untere

[1]) Der Apparat ist zum Preise von 30 Mk. bei Frz. Hugershoff, Leipzig, Karolinenstraße 13, in Österreich bei K. Liebert, Wien, IX., erhältlich.

[2]) *H. Breyer* und *P. Grützner*, Tübingen, Ein einfacher Hämometer für den praktischen Arzt. Münchener med. Wochenschr. Bd. 52. S. 1521 (1905).

[3]) Er macht übrigens darauf aufmerksam, daß man der Hämometer und nicht das Hämometer sagen soll, da es sich um einen Messer (μετρης), nicht um ein Maß (μετρον) handelt.

spitze Winkel von etwa 20° ist abgerundet, die Schichtdicken betragen zwischen 3 und 15 *mm*. Die vorderen und hinteren Flächen bestehen aus wasserhellem Glas, die Seitenwände aus Messingblech, das innen mit dünnem Glas belegt ist. Füllt man das Gefäß mit 100- oder 200fach verdünntem Blut (zur Verdünnung ist eine Pipette von 2 $cm^3$, die außerdem eine Marke entsprechend 20 $mm^3$ weniger als 2 $cm^3$ besitzt, und eine feine Pipette mit 20 $mm^3$-Marke für das Blut beigegeben), so sehen die dicken Schichten rot, die dünneren gelblichrot, die dünnsten hellgelb aus. Vor der vorderen, senkrecht stehenden Fläche des Keils gleitet in Schienen ein Schieber aus Messingblech vorbei, in welchem sich drei übereinanderstehende horizontale Schlitze befinden (je 1·5 *mm* breit und je 1 *mm* voneinander entfernt) (siehe Fig. 249). Die hintere Wand ist durch eine Milchglasplatte verdeckt. Die Spitze des Keils sitzt in einem Metallstab, durch den der ganze Apparat festgestellt werden kann.

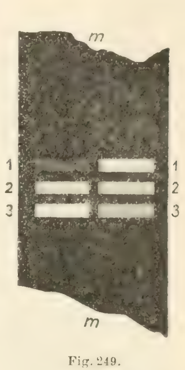


Fig. 249.

Der Schieber besitzt außerdem noch drei weitere gleiche Schlitze, hinter denen die Vergleichsfarbe vorbei geführt wird. Diese besteht aus einer Leimplatte, die durch Pikrokarmin gefärbt ist und zwischen dünnen wasserklaren Glasplatten wasserdicht aufbewahrt wird; sie müssen auch vor Licht geschützt gehalten werden. Nach Angabe von *Grützner* besitzen diese Platten genau den Farbenton der Blutlösung. Es werden zwei derartige Leimplatten gegeben. Die eine dunklere entspricht der Farbe 100fach verdünnten normalen Blutes bei 5 *mm* Schichtdicke, die zweite hellere der von 200fach verdünntem Blut in gleicher Schicht.

Die Vergleichung gestaltet sich nun so, daß man bei senkrechter Einstellung oder Haltung des Keils *3* verschieden tief gefärbte Striche (in Fig. 249 links) neben drei gleichgefärbten der Vergleichsfarbe sieht. Man stellt die Grenzen ein, bei denen der mittlere Strich mit der Vergleichsfarbe übereinstimmt. Der Apparat ist mit normalem menschlichen Blut so geaicht, daß eine 5 *mm* dicke Schicht 100fach verdünnten Blutes der normalen Blutfarbstoffmenge entspricht. Man beobachtet unter Abblendung von Nebenlicht durch einen Pappschirm oder ähnliches und verschiebt den Schieber am besten mit dem Daumen der linken Hand, während die linke Hand selbst den Apparat hält und die Rechte den Abblendungsschirm. Dem Apparat sind Tabellen beigegeben, welche den Prozentgehalt an Blutfarbstoff (Normalgehalt = 100) abzulesen gestatten. Die Reinigung des Apparates ist außerordentlich einfach, ebenso die Handhabung. Die Genauigkeit in den tieferen Abschnitten des Keils beträgt 2—4% Hämoglobin. Eine Hebung des Schiebers um 1 *mm* bedeutet unten 5—6%, oben aber nur 2%. Man wird sich daher bemühen, im oberen Teil einzustellen.

4. Keilhämometer nach *Plesch.* (Schmidt & Hänsch, Berlin.) (Fig. 250, 251.)

Das eine zweier genau gleichweiter Röhren *(R)* enthält die Testlösung, eine 200fach verdünnte Lösung eines Blutes, das 20 Vol.-% Kohlenoxyd bindet. Das Rohr wurde mit reinem Kohlenoxyd gefüllt und zugeschmolzen. In ihm steht weiter ein 10 *cm* langer, massiver, schräg abgeschliffener Glaskeil, der Kolbenkeil *K* (Fig. 251 im vertikalen Durchschnitt). Das Rohr trägt eine Teilung von 0—100 *mm*, jeder Millimeter bedeutet 1% Schichtdickenzunahme der Testlösung. In einem zweiten, gleichweiten Rohr $R_1$ befindet sich die zu untersuchende 200fach verdünnte Blutlösung. Beide Röhren stecken bei der Farbenvergleichung vertikal in einem horizontal stehenden schmalen Kasten, der an der einen Schmalseite den Okularspalt *O*, an der anderen eine Milchglasscheibe trägt. Die Beobachtung kann auch bei künstlichem Licht erfolgen.

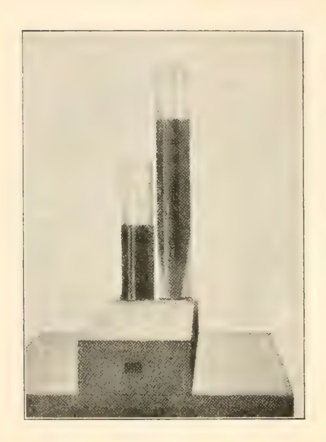


Fig. 250.

Man saugt das Blut vom Ohrläppchen bis zur unteren Marke in einer beigegebenen Pipette auf und verdünnt es durch mit Leuchtgas gesättigtes Wasser 200fach (obere Marke). Die Lösung kommt in Rohr $R_1$ neben Rohr *R* in den Kasten. Rohr *R* kann in einer Führung verschoben werden. Das von der Milchglasplatte durchgelassene Licht wird durch zwei 1 *mm* breite Spalten abgeblendet, bevor es die Röhren passiert.

Man verschiebt die Röhre *R* bis zur Farbengleichheit mit Rohr $R_1$ und findet durch Multiplikation der Millimeterzahl mit 0·2 (20 Vol.-% CO) die CO-Kapazität des Blutes.

5. Der *Gowers*sche Hämoglobinometer, modifiziert von *Haldane*[1]).

Das Instrument besteht aus 2 Glasröhren von beliebiger Weite (meist etwa 6 *mm*), bei denen es nur Erfordernis ist, daß sie beide genau gleichweit sind. Sie sind unten zugeschmolzen. Die eine zur Aufnahme der zu untersuchenden Blutlösung bestimmte ist bei dem älteren Instrument mit einer Skala versehen. Als Vergleichslösung gebrauchte *Gowers* eine Pikrokarmingelatinelösung. Es hat sich aber gezeigt, daß diese nicht haltbar ist. Sie wird beim Stehen im zugeschmolzenen Rohr meist gelber und tiefer im Ton, so daß die damit erhaltenen Resultate viel zu niedrig sind.

[1]) *J. Haldane,* Determination of Haemoglobin. Journ. of Physiol. Vol. **26**. p. 497 (1901).

So fand *Haldane* Abweichungen von 30—40% nach unten und bei einem anderen älteren Instrument 42% nach oben. Frisch bezogene Röhrchen hatten nur 3% Abweichung.

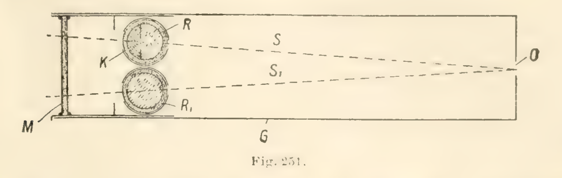



Fig. 251.

Es empfiehlt sich daher, an Stelle der künstlichen Lösung nach dem *Haldane*schen Vorschlag eine Kohlenoxydhämoglobinlösung zu benutzen, die folgendermaßen hergestellt wird: Das zur Aufbewahrung dienende Rohr wird in der beistehend skizzierten Weise (Fig. 252) an einer Stelle verengt und eine genau 1%ige Lösung von frischem Ochsenblut eingefüllt. Man leitet durch die Lösung einige Minuten Leuchtgas und schmilzt das Rohr, das mit Leuchtgas erfüllt ist, an der engen Stelle *A* über einer Stichflamme ab. Diese verdünnte Kohlenoxydhämoglobinlösung hält sich unbegrenzt lange unverändert. Von dem benutzten Ochsenblut wird mit Hilfe der Ferricyankaliummethode oder der Blutgaspumpe das Sauerstoffbindungsvermögen nach Schüttlung mit Luft (= CO-Kapazität) bestimmt und danach die Testlösung auf Sauerstoffprozente geaicht.

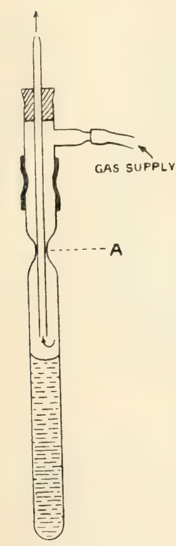



Fig. 252.

Von dem zu untersuchenden Blut wird eine bestimmte Menge (0·05 *cm*³) aus einer genau ausgewogenen Kapillarpipette in das zweite Gläschen des Apparates getan, in dem sich eine kleine abgemessene Menge destillierten Wassers schon befindet. Es wird darauf die Lösung mit Leuchtgas gesättigt und so lange aus einer genauen Bürette Wasser unter mehrfacher Wiederholung der Gassättigung tropfenweise hinzugegeben, bis die Färbung in beiden Röhrchen gleich ist. Man beobachtet bei durchfallendem Licht (helles Fenster oder hellbeleuchtete Milchglasscheibe), und zwar indem man die Stellung der Gläser gegeneinander mehrfach wechselt. Nach den Angaben von *Haldane* ist es gleichgültig, ob man bei Tages- oder Gaslicht untersucht. *Haldanes* Bestimmungen waren auf 0·8% genau bei 2—6 Ablesungen. Leider kann nicht jeder Beobachter die feinen Farbennuancen, die das Endresultat sehr erheblich beeinflussen, erkennen. Es gehört ein besonders gutes Farbenunterscheidungsvermögen dazu.

Aus der Verdünnung berechnet man das Verhältnis zu der 1%igen, als Standard dienenden Blutlösung. Da man von dieser das Sauerstoffbindungsvermögen kennt und außerdem nach *Haldanes* zahlreichen Erfahrungen die Gesamtfärbekraft der Gasbindung proportional verläuft, so hat man direkt die Sauerstoffkapazität des Blutes auf diese Weise sehr einfach und mit großer Genauigkeit ermittelt.

Die Modifikation des *Gowers*schen Apparates von *Sahli*[1]): Hämatinometer (Fig. 253).

Durch Zusatz von Salzsäure zur Blutlösung wird Hämatin gebildet und als Vergleichslösung eine Hämatinlösung benutzt. Man bestimmt in diesem Falle also nur den Hämatinteil, d. h. den eisenhaltigen Komplex im Blutfarbstoff. Da aber nicht sicher feststeht, daß der Blutfarbstoff immer die gleichen Mengen von Eisen enthält, so kann man die so gewonnenen Werte nicht ohne weiteres auf den Gehalt an frischem Blutfarbstoff, Hämochrom, übertragen. Die Bestimmung ist recht genau und die Hämatinlösung gut haltbar. Besitzt man einen *Haldane*schen Hämometer außerdem, so kann man interessante und oft wichtige Beziehungen zwischen Gesamtfärbekraft und Hämatin-, d. h. Fe-Gehalt aufdecken.



Fig. 253.

*b)* Die komplizierten Blutfarbstoffbestimmungsmethoden.

1. Der *Miescher*sche Hämometer.[2])

Der Apparat (siehe Fig. 254) ist aus dem *Fleischl*schen durch mehrfache recht erhebliche Verbesserungen entstanden. Er beruht darauf, daß man die verdünnte Blutlösung in einem Kästchen *Ma* vergleicht mit Wasser, das sich in einem gleichgroßen Kästchen *Ma'* befindet, unter dem ein Keil *R* aus Goldpurpurglas vorbei geführt wird. *Miescher* hat einen sehr fein konstruierten Melangeur *(Mel)* angegeben, ein etwas größeres Modell seiner Mischpipette zur Blutkörperchenzählung. An der Meßkapillare sind drei Teilstriche in Form von Ringmarken angebracht, die Ver-

---

[1]) *E. Sahli*, Lehrbuch der klinischen Untersuchungsmethoden. S. 658 (1905).

[2]) *F. Miescher*, Über die Beziehungen zwischen Meereshöhe und Blutbeschaffenheit. Gesamm. Abhandl. S. 334 und 356 (1897). — *E. Veillon*, Ebenda. S. 423 und Arch. f. experim. Pathol. S. 39 (1897). — *Franz Müller*, Zur Kritik des *Miescher*schen Hämometers. Arch. f. Anat. u. Physiol. Suppl.-Bd. **130** (1901); Bd. **443** (1906).

dünnungen von 200, 300, 400 entsprechen. Neben den Teilstrichen befinden sich noch Hilfsteilstriche, die die Sicherheit der Verdünnung außerordentlich erhöhen.

Die Kammer besteht aus einem massiven Messingzylinder *M*, in dessen Mitte parallel zu seiner Achse ein Lumen von 7 *mm* Breite und 18 *mm* Länge ausgehöhlt ist. Eine schmale Zwischenwand *D'* teilt das Lumen in zwei gleiche Hälften. Die Zwischenwand ragt über der oberen ebenen Fläche des Messingzylinders um etwa 1 *mm* heraus und reicht beiderseits bis an die Peripherie. Man schraubt den Zylinder auf eine planparallele Glasplatte in dem Messingring fest und verschließt ihn nach Füllung durch ein planparalleles dickes Deckglas *D* mit einer den über-

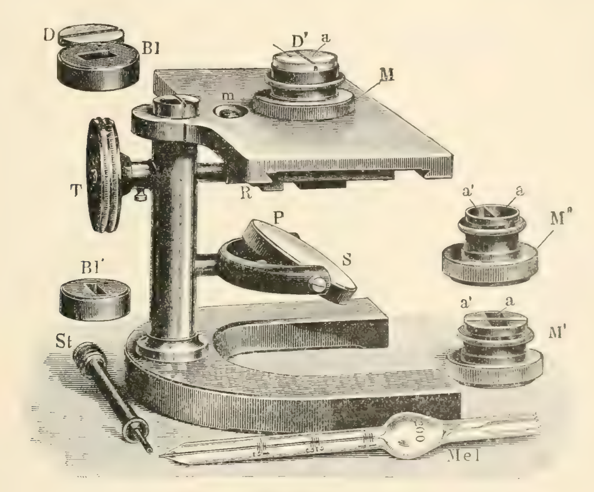



Fig. 254.

ragenden Teil der Zwischenwand einnehmenden Rinne. Über das Deckglas setzt man eine Blende mit rechteckiger Öffnung *Bl*. Der Messingzylinder wird in einen Ausschnitt eines Rahmens gesetzt, in dem sich der Glaskeil mit Hilfe einer leicht bewegbaren Schraube *T* in horizontaler Richtung bewegen läßt. Der Rahmen steht auf einem festen Gestell. Man untersucht bei Lampen- oder Kohlenfadenglühlicht (nicht Auer- oder Metallfadenlicht) am besten im Dunkelzimmer oder unter vollkommener Abblendung von Seitenlicht. Das Licht fällt auf einen Gipsschirm *P S*, der sich unterhalb des Rahmens und des Keiles befindet und das Licht von dort nach oben reflektiert.

Einige Vorsichtsmaßregeln bei der Gewinnung und Verdünnung des Blutes (es wird mit 0·1%iger Sodalösung verdünnt) sind bei Besprechung

der Blutkörperchenzählung (S. 707 ff.) erwähnt worden. Bei Beschickung der Kammer muß dafür gesorgt werden, daß die untere abschließende Glasplatte faserfrei gesäubert ist, und daß nach Einfüllung von Wasser in die eine Hälfte der Kammer *(Ma)* kein Übertritt in die andere *(Ma')* stattfindet. Man füllt nun so viel Wasser resp. verdünntes Blut ein, daß ein schwacher Meniskus überragt und schiebt das obere Deckglas von der Seite her horizontal auf, ohne daß sich die beiden Flüssigkeiten vermischen dürfen. Nach einiger Übung bekommt man das Gefühl fest genug aufzudrücken und so zu verschieben, daß keine Luftblasen in die Kammer eintreten. Die Ablesungen haben nach Aufsetzen der Blende möglichst schnell zu erfolgen, und zwar mindestens 10 hintereinander, aus denen das Mittel genommen wird.

Für vergleichende, relative Hämoglobinbestimmungen kann der Hämometer von *Miescher* mit als das beste Instrument bezeichnet werden. Die Fehler sind außerordentlich gering. Ich fand bei Vergleichsbestimmungen bei 25–52 Ablesungsreihen von je 10 Ablesungen 0·35—0·48% mittleren Fehler.

Der ursprünglich nach Angaben von *Miescher* verfertigte Goldpurpurglaskeil war geaicht worden durch Trockensubstanzbestimmungen einer Lösung von kristallisiertem Hämoglobin. Es wurde bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (ungefähr 5 Tage). Es ist aber zweifelhaft, ob nicht bei Temperaturen von 105—120°, bei denen man allein Gewichtskonstanz erzielen kann, flüchtige Stoffe verloren gehen.[1]) Eine Bestimmung durch Eisenanalyse ist nicht angängig, da zurzeit zum mindesten unsicher ist, ob die Beziehungen zwischen Eisen und Farbintensität im genuinen Blutfarbstoff konstant sind. So gibt es also keine sichere Aichungsmöglichkeit dieses oder eines anderen Instruments, wenn man nicht die vorhin erwähnten Beziehungen zwischen Färbekraft und Sauerstoffbindungsvermögen mit *Haldane* als Grundlage annimmt.

Tatsächlich stellte sich auch heraus, daß die jedem Apparat beigegebenen Tabellen durchaus nicht immer mit direkten Trockensubstanzbestimmungen von Lösungen kristallisierten Hämoglobins oder Eisenanalysen übereinstimmende Zahlen liefern. So fand ich bei Pferdeblutkristallen pro Liter der Lösung mit einem neueren Hämometerkeil 1·477, mit einem anderen älteren 1·382 *g*, durch Trockensubstanzbestimmung (bei 116°) aber 1·446 *g*. Berechnet man nach Eisenwerten, so stimmen die Tabellen für 0·42% Eisen in 100 Blutfarbstoff, während wir zurzeit, wenn wir überhaupt Konstanz des Eisens zugeben, 0·336% Eisen anzunehmen haben. Die Zahlen erniedrigen sich dann um 20%! Da wir aber zurzeit überhaupt nicht wissen, inwieweit der Farbstoff des frischen Blutes im Eisen- und Trockensubstanzgehalt dem kristallisierten Hämoglobin entspricht, ist eine derartige Aichung prinzipiell zu verwerfen. Will man überhaupt aichen, so sollte man, wie bei *Gowers-Haldane,* nach Blut aichen, in dem das CO-

[1]) Es wird dies in einer soeben erschienenen Arbeit von *E. E. Butterfield* (Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **62**. S. 195 [1909]) allerdings geleugnet.

oder $O_2$-Bindungsvermögen bestimmt ist, und so die Tabellen neu entwerfen. Eine auf Vergleich mit *Hüfners* Spektrophotometer gegründete Aichung ist auch unmöglich, da dieses geradeso erst nach Kristallösungen eingestellt wird und noch dazu die Ablesungsfehler nicht geringer sind.

Für fast alle Zwecke ist auch die absolute Hämoglobinzahl ganz gleichgültig und die Verwendbarkeit des Apparates für vergleichende Bestimmungen zu verschiedenen Zeiten dadurch in keiner Weise beeinträchtigt.

2. Die kolorimetrische Doppelpipette von *Hoppe - Seyler* (Fig. 255).

Der Apparat besteht aus dem Fernrohr *F*, dem Kollimatorrohr *C* und der eigentlichen Doppelpipette *P*; *F* und *C* sind zu einem geraden

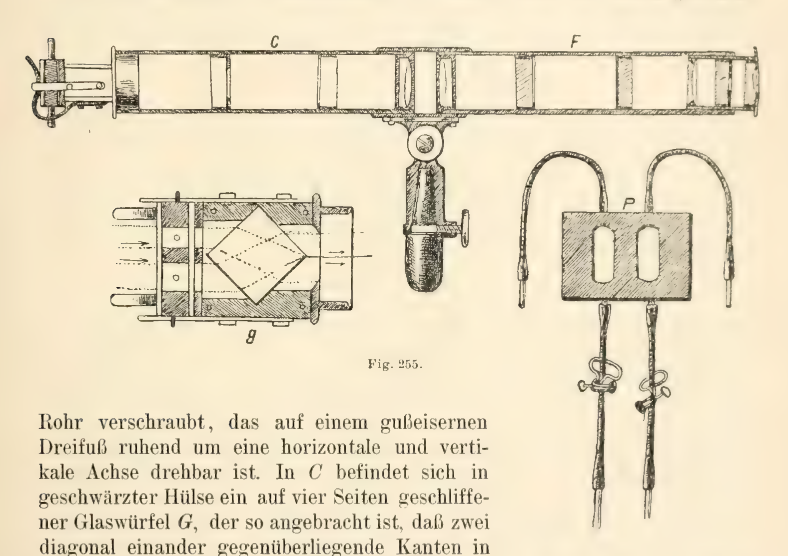



Fig. 255.

Rohr verschraubt, das auf einem gußeisernen Dreifuß ruhend um eine horizontale und vertikale Achse drehbar ist. In *C* befindet sich in geschwärzter Hülse ein auf vier Seiten geschliffener Glaswürfel *G*, der so angebracht ist, daß zwei diagonal einander gegenüberliegende Kanten in der optischen Achse des Fernrohres liegen, und daß die dem Fernrohr zugekehrte Kante zugleich in der Brennweite der Kollimatorlinse liegt. Nach vorn ist der Apparat durch eine Glasplatte abgeschlossen, an die sich die Mischpipette *P* anschließt. Diese besteht aus einer rechteckigen Messingplatte von 0·5 *cm* Dicke, in der zwei durch eine 3·5 *mm* breite Wand voneinander getrennte Kammern ausgeschnitten sind. Setzt man dies Messingstück an die vorher genannte Glasplatte vor *C* an und preßt durch eine Feder von außen eine zweite Glasplatte dagegen, so bildet man zwei voneinander abgeschlossene Kammern. Jede dieser hat oben und unten je einen Schlauchansatz, mit Schläuchen armiert, zur Füllung mit den Farbstofflösungen.

Das Licht, das zum Auge des Untersuchers am Okular des Fernrohres dringt, passiert beide Kammern, wird dann so gebrochen, daß die dem Auge zugekehrte Kante des Glaswürfels *G* scheinbar allein die Grenzlinie zwischen den zwei durch eine zarte vertikale Linie voneinander getrennten Gesichtshälften bildet. Als Standardlösung benutzte *Hoppe-Seyler* eine Lösung von Kohlenoxyd-Hämoglobin (Kristalle). Das zu untersuchende Blut wird gleichfalls mit Kohlenoxyd gesättigt und kohlenoxydgesättigtes Wasser so lange hinzugefügt und immer wieder aus der Kammer abgelassen, bis die Blutlösung genau die gleiche Farbe der Normallösung erreicht hat. Die Menge des Wassers wird an der Bürette abgelesen. Ist p das Gewicht der zu untersuchenden Blutprobe, c der Prozentgehalt der Standardlösung CO-Hb, v das Volumen, auf welches die abgelesene Blutprobe gebracht werden mußte, so ist der prozentische Farbstoffgehalt

$$H = \frac{v \times c}{p}.$$

Der Apparat ist im letzten Jahrzehnte nicht mehr viel angewendet worden, aber die, welche mit ihm gearbeitet haben, loben die ungemeine Schärfe, mit der auch geringe Farbendifferenzen sichtbar werden.

Er ließe sich leicht so vereinfachen, daß die eine Kammer dauernd mit einer Kohlenoxydhämoglobinlösung beschickt bleibt, deren Gasbindungsvermögen bekannt ist.

### 3. Das Chromophotometer von *Plesch*.

Das Chromophotometer[1]) (siehe Fig. 256) besteht zunächst aus einer auf der Grundplatte *1* angeordneten Kammer *2*, die an der Vorderseite eine Milchglasplatte *3* trägt, durch welche das Licht in den Raum *2* gelangt und hier zwei hintereinander liegende Spiegel (Prismen) *4*, *5* beleuchtet. Die reflektierende Fläche dieser Spiegel liegt in einem Winkel von ungefähr 45°, so daß zwei Lichtbüschel reflektiert werden, die aus der Kammer *2* durch Öffnungen *6*, *7*, die durch eine gemeinsame Glasplatte *8* bedeckt sind, herausstrahlen. Das von dem ersten Spiegel *4* erzeugte Lichtbüschel gelangt auf ein Prisma *9*, um hier rechtwinklig reflektiert zu werden. Die reflektierten Lichtstrahlen gehen zunächst durch die mit der Farblösung gefüllte Teströhre *10*, so daß der Lichtstrahl die Färbung der Testflüssigkeit erhält. Der gefärbte Lichtstrahl fällt nun in den *Lummer-Brodhun*schen Würfel.

Bei dem Chromophotometer besteht der *Lummer-Brodhun*sche Würfel aus zwei Prismen, deren Hypotenusenflächen aneinander gekittet sind. Das eine Prisma hat in der Mitte auf der Hypotenusenfläche eine kreisrunde, matte Fläche. Diejenigen Lichtstrahlen, die auf den mittleren

---

[1]) Der Apparat (D. G. M. 301.324) wird hergestellt von der Firma Franz Schmidt & Haensch, Optische Werkstatt, Berlin, Prinzessinnenstraße 16. — *J. Plesch,* Chromophotometer, ein neuer Apparat zur Bestimmung der Konzentration von Farblösungen. Zeitschr. d. klin. Med. Bd. **63**. Heft 5/6 (1907).

Teil *12* fallen, werden senkrecht nach oben reflektiert, dagegen gehen diejenigen Lichtstrahlen, die seitlich von der matten Fläche auffallen, frei durch den Würfel und werden über die Linsen *14*, *15* dem Augendeckel *16* zugeführt, so daß das Auge des Beschauers eine beleuchtete gefärbte Fläche in Form eines Kreises erblickt, dessen Mitte freibleibt.

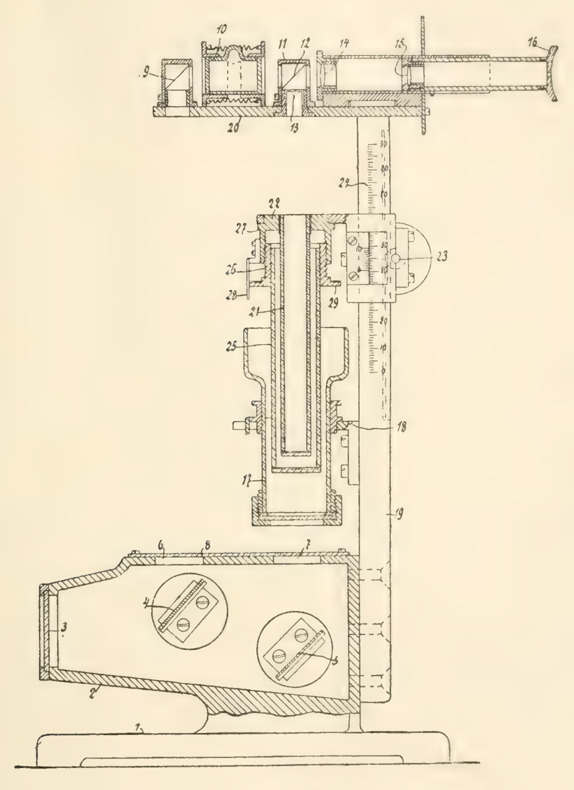


Fig. 256.

Das zweite von dem Spiegel *5* der Kammer *2* reflektierte Lichtbüschel gelangt, nachdem es die Öffnung *7* der Kammer *2* verlassen hat, in die zu untersuchende Flüssigkeit, die sich in einem Glasrohre *17* befindet, durchläuft dieselbe und gelangt ebenfalls in den *Lummer-Brodhun*schen Würfel *11*. Von diesem Lichtbüschel werden diejenigen Strahlen, welche auf den Teil des Würfels seitlich zur matten Fläche *12* auftreffen, durch

den Würfel hindurchgehen, also im Gesichtsfeld nicht sichtbar sein, während diejenigen Lichtstrahlen, die auf die matte Fläche *12* fallen, rechtwinklig reflektiert werden und ebenfalls in den Augendeckel *16* gelangen. Sie beleuchten die oben erwähnte, von den anderen Strahlen freigelassene Mitte des Kreises. Diese beleuchtete ebenfalls kreisförmige Fläche liegt konzentrisch innerhalb des erstgeschilderten Kreises. Das rohrförmige Glas *17*, das die zu untersuchende Flüssigkeit enthält, ist mit einem Bügel *18* an dem Ständer *19* starr befestigt, der seinerseits an der Hinterseite der Kammer *2* angeordnet ist und am oberen Ende eine Platte *20* trägt, die in der aus der Figur ersichtlichen Weise das Prisma *9*, die Teströhre *10*, den *Lummer-Brodhun*schen Würfel *11*, den Tubus *16* und die optische Korrektion *13* aufnimmt.

Innerhalb des rohrförmigen Glases *17* ist ein zweites Rohr *21* angeordnet, welches in einem Bügel *22* sitzt, der auf dem Ständer *19* mittelst eines Zahnstangengetriebes *23* nach Maßgabe einer Skala *24* in der Höhe verstellt werden kann. Je mehr dieses Rohr *21* in die in dem Rohr *17* befindliche zu untersuchende Flüssigkeit eintaucht, wird die Schichthöhe dieser Flüssigkeit, die von dem von Spiegel *5* reflektierten Lichtbüschel zu durchlaufen ist, verringert, so daß man durch Verstellung dieses Rohres *21* mittelst des Getriebes *23* die Schichthöhe so lange ändern kann, bis die beiden dem Auge sichtbaren Kreise die gleiche Färbung besitzen. Die jeweilige Verstellung wird an der Skala *24* abgelesen, so daß hieraus ohne weiteres der Färbungsunterschied der zu untersuchenden Flüssigkeit, gegenüber der in der Teströhre *10*, festgestellt werden kann.

Um den Apparat für jegliche Farbkonzentrationsbestimmung brauchbar zu machen, ist dem Chromophotometer ein Glastrog von derselben Breite wie die Länge der Röhre beigegeben. Um die Gleichheit der Lichtintensität nicht zu stören, mußten sämtliche Glasplatten aus demselben Glas geschnitten werden.

Das Prinzip des Apparates. Gießen wir in den Zylinder *17* dieselbe Flüssigkeit, mit welcher die Röhre *10* gefüllt ist, so wird bei der bestehenden gleichen Belichtung Farbengleichheit des Gesichtsfeldes dann eintreten, wenn die Verschlußplatte des Tauchzylinders von dem Boden des Tauchtroges genau so weit entfernt ist, als die Röhre *10* lang ist, d. h. die Schichtdicken gleich sind. Die dem Apparat beigegebene Röhre *10* ist 20 *mm* lang, somit wird bei gleich konzentrierten Farblösungen der Nonius 20 *mm* Schichtdicke zeigen müssen. Ist die untere Schichtdicke größer als 20 *mm*, so wird auf diesem Wege weniger Licht durchdringen können als auf dem Wege durch die Teströhre, der innere Ring wird dunkler sein. Ist hingegen die Schichtdicke unten kleiner als 20 *mm*, so wird der innere Ring heller als der äußere erscheinen. Ebenso verhält es sich bei derselben Schichtdicke, aber verschiedener Konzentration der Flüssigkeiten. Ist die Flüssigkeit im Tauchtrog *17* weniger konzentriert als die in der Röhre *10* befindliche, so wird die Schichtdicke im Tauchtrog größer als 20 *mm* sein müssen, um Gleichheit im Gesichts-

felde hervorzurufen; ist sie konzentrierter, so wird die Schichtdicke geringer als 20 *mm* sein.

Es besteht also ein ungekehrtes Verhältnis zwischen Konzentration and Schichtdicke:

$$c_1 : c_2 = s_2 : s_1$$

wobei $c_1$ die bekannte Konzentration der Testlösung,
$c_2$ die gesuchte Konzentration der zu untersuchenden Lösung,
$s_1$ die bekannte Schichtdicke der Teströhre,
$s_2$ die gefundene Schichtdicke im Tauchtrog bedeutet.

Die gesuchte Konzentration ist somit aus der Formel

$$c_2 = \frac{c_1 s_1}{s_2}$$

leicht zu berechnen. Zur Hämoglobinbestimmung brauchen wir eine Testlösung von bekannter Hämoglobinkonzentration oder ein anderes Vergleichsobjekt, welches der Farbe des Blutes in bestimmter Konzentration entspricht.

Die Vorteile des Kohlenoxydhämoglobins als Vergleichsflüssigkeit liegen darin, daß erstens die Farbengleichheit mit dem zu untersuchenden Blute, dessen Farbstoff durch Durchleiten von Leuchtgas ebenfalls in Kohlenoxydhämoglobin umgewandelt wurde, die größte ist, zweitens wird bei bekannter Konzentration der Testlösung mit Hilfe der angegebenen Formel der richtige Hämoglobinwert der zu bestimmenden Lösung direkt zu berechnen sein und drittens ändert die Lösung ihre Farbe nicht.

Die Testlösung wurde durch Eisenanalyse kalibriert:

Das Blut wurde einem Kalbe entnommen und durch kräftiges Schütteln mit Quecksilber defibriniert. Nach mehreren gut übereinstimmenden Bestimmungen des Eisens nach *Neumann* war im Mittel in 10 $cm^3$ des untersuchten Blutes 26·17 *mg* Eisen enthalten. Zur Berechnung des Hämoglobins nahm *Plesch* die *Jaquet-Hüfner*sche Zahl von 0·336% Fe an. Somit enthielt das Blut 7·78% Hämoglobin. Eine größere Menge dieses Blutes wurde in besonderen Gefäßen aufbewahrt. Die Glaskolben waren oben und unten mit eingeschliffenen, einfach durchbohrten Hähnen, die mit einem kapillaren Schlauchansatz versehen sind, verschlossen. Das evakuierte Glasgefäß wurde mit dem Blute halb gefüllt und dann reines Kohlenoxyd mehrmals eingesaugt und kräftig geschüttelt. Die Verwendung von Leuchtgas als Kohlenoxydquelle ist bei der Testlösung nicht ohne weiteres zulässig, da wenigstens das Berliner Leuchtgas zu allmählich eintretenden Farbänderungen Anlaß gibt. Will man sich jetzt aus diesem Blut eine Lösung machen, so verbindet man die obere Kapillarröhre mit einem Kohlenoxydgasometer, öffnet den Hahn und läßt unten beliebige Mengen des Blutes ausfließen. Soll dieses Blut einer 250fach verdünnten 14%igen Hämoglobinlösung entsprechen, muß es nach *Pleschs* Berechnung 150·38mal verdünnt werden. Diese Lösung ist bei dem Fabrikanten stets vorrätig, doch kann sie auch von jedermann auf dem beschriebenen Wege verfertigt werden. Noch richtiger ist, eine

Lösung von etwa 20 Volumprozent CO-Maximalbindung zugrunde zu legen, wie es *Haldane* und *Plesch* auch tun.

Die Empfindlichkeit des menschlichen Auges ist viel größer für helle als für dunkle Farbentöne. Es wurde darum die Verdünnung von 1 : 250 gewählt, weil bei 2 *cm* Schicht der Farbenton einer 14%igen Hämoglobinlösung am feinsten bestimmbar ist.

Die Füllung der Teströhre geschieht in der Weise, daß man die Röhre mit der kohlenoxydgesättigten Blutlösung bis zirka 2 *mm* vom Rande füllt und, indem man einen CO-Strom über die Röhre strömen läßt, schnell mit dem Deckgläschen schließt. Um einen luftdichten Abschluß zu sichern, ist es gut, die Ränder der Röhre mit einer dünnen Schicht Fett zu beschmieren. Sobald wir die Röhre in horizontale Lage bringen, sammelt sich das Kohlenoxydgas in der oberen kuppelartigen Ausbuchtung und die Flüssigkeit füllt das Lumen aus; so ist die Blutlösung auf zweckentsprechende Weise unter Kohlenoxydatmosphäre dicht abgeschlossen, ohne das Gesichtsfeld zu beeinträchtigen. Die Verschlußplatten der Röhre sind durch zwei mit Klammern befestigte Metallrahmen gegen Verschiebung gesichert.

Als Lichtquelle kann natürliches und künstliches Licht verwendet werden, dabei ist nur zu beachten, daß nicht das total reflektierende Prisma und der Würfel durch direkte Bestrahlung viel Nebenlicht erhält. Zum Abblenden von Nebenlicht ist am Apparat ein Augenschirm angebracht.

Die Ausführung einer Hämoglobinbestimmung. Durch das Anbringen der Prismen *4* und *5* ist eine gleichmäßige Belichtung gesichert. Treten somit Verschiedenheiten im Gesichtsfelde auf, so kann die Ursache nur im Wege der Lichtstrahlen liegen, das heißt in den Scheiben, Prismen oder in der Flüssigkeit. Einerseits um den Apparat ohne Farbflüssigkeit und mit Farbflüssigkeit prüfen zu können, andrerseits um den Apparat für jede kolorimetrische Bestimmung brauchbar zu machen, ist dem Chromophotometer ein offener planparalleler Trog beigegeben, dessen planparallele Platten von derselben Scheibe geschnitten sind wie die Platten am Tauchtrog und am Tauchzylinder, sowie die Scheiben der Teströhre. Dadurch sind die Lichtabsorptionsverhältnisse auf beiden Wegen des Strahlenganges dieselben. Ist der planparallele Trog und der Tauchtrog leer, so muß das Gesichtsfeld gleichmäßig sein. Sind die Scheiben verunreinigt, so ist natürlich die Lichtabsorption verändert. Ebenso treten Fehler auf, wenn die zu untersuchende Flüssigkeit trübe ist und herumschwimmende Staubteilchen enthält. Es ist deshalb saubere Arbeit Bedingung, um genaue Resultate zu erhalten. Die Scheiben sind stets zu reinigen und die Flüssigkeit ist zu filtrieren. Die Prismen und der Würfel sind durch Metallgehäuse gut geschützt und wenn der Apparat zugedeckt aufbewahrt wird, ist eine Reinigung dieser Teile kaum nötig. Die lichtbrechenden Medien sollen nie mit ungeschützten Fingern angefaßt werden, sondern stets mit einem nicht staubenden Seiden-, Leinen- oder Lederlappen gereinigt werden. Es sind dies Vorsichtsmaßregeln und Weisungen, die bei jedem optischen Instrument zu befolgen, aber wegen der Empfind-



lichkeit des Chromophotometers gegen Lichtdifferenzen hier besonders zu betonen sind.

Es kann vorkommen, daß Schatten im Gesichtsfelde auftreten. Diese rühren meist von Luftblasen her, die sich an der unteren Platte des Tauchzylinders befinden. Durch Hin- und Herbewegen, Andrücken an die Platte des Tauchtroges oder Hinausheben aus der Flüssigkeit ist dieses Übel sehr rasch beseitigt.

Zur Ausführung einer Hämoglobinbestimmung ist dem Chromophotometer noch eine Kapillarpipette und ein Meßgefäß beigegeben. Die Kapillarpipette besitzt zwei Marken, und zwar bei 0·1 und 0·2 $cm^3$.

Das Meßgefäß ist von zylindrischer Form und hat einen engen langen Hals. An dem Hals sind zwei Marken bei 50 und 51 $cm^3$ angebracht, um nicht eine neue Lösung bereiten zu müssen, im Fall nicht genau auf die Marke 50 eingefüllt wurde.

Der Gang einer Hämoglobinbestimmung ist folgender: Zunächst müssen wir stets kontrollieren, ob nicht Verunreinigungen im optischen System vorhanden sind und ob wir ein gleichmäßig beleuchtetes Gesichtsfeld haben. Das prüfen wir am besten so, daß wir alle dazwischen geschalteten Gläser (Tauchtröge, Teströhre) entfernen.

Das Blut wird dann unter Anwendung der üblichen Kautelen entnommen. Der ausgetretene Blutstropfen wird mit der Kapillarpipette bis zur Marke aufgesaugt und in den Meßkolben gebracht. Es ist angezeigt, in den Meßkolben schon vorher die Sodalösung von 1‰ zu bringen, mit welcher wir die Pipette ausspülen. Haben wir das Blut aus der Pipette ausgewaschen, wird der Meßkolben bis zur Marke 50 oder, wenn das nicht gelingt, bis zur Marke 51 aufgefüllt.

Die Lösung muß dann mit Kohlenoxyd in einem großen Kolben gesättigt werden. *Oerum*[1]) empfiehlt folgende von *Bunsen* herrührende Methode zur Herstellung von reinem Kohlenoxyd. 13 Gewichtsteile ameisensaures Natron werden mit 10 Gewichtsteilen konzentrierter Schwefelsäure (132 und 98) gemischt. Diese Mischung gibt in der Kälte vollständig reines Kohlenoxyd. 13 *g* ameisensaures Natron geben 4 *l* CO. Es ist einfacher und hier auch erlaubt, zur Sättigung Leuchtgas zu benutzen, nur ist es angezeigt, das Gas zuvor durch eine Wasserflasche zu leiten, da es sonst das Blut eventuell verunreinigt. Bei der Größe der Verdünnung von 1 : 250 ist schon eine sehr geringe Menge CO genügend, um Sättigung herzustellen. Man braucht daher Leuchtgas nicht lange hindurch zu leiten.

Bevor wir die gesättigte Lösung in den Tauchtrog bringen, ist es nötig, daß wir uns überzeugt haben, ob dieselbe nicht trübe ist oder Staubpartikel enthält. Es ist gut, die Flüssigkeit stets durch gehärtete Filter zu filtrieren. Jedes einzelne Staubpartikelchen wird durch darauffallendes Licht selbstleuchtend und gewinnt eine völlig unbestimmbare

[1]) *H. P. T. Oerum,* Über die Methoden der Hämoglobinbestimmung. Festschrift für *Olof Hammarsten.* Upsala 1906.

optische Wirkung, welche den Strahlengang im Chromophotometer stört. Die Fehler, welche so entstehen, sind verhältnismäßig groß. (Bei gleicher Konzentration der Lösungen bis zu ein Millimeter Differenz in der Dicke der Schicht.)

Von der Kohlenoxydhämoglobinlösung werden 20—25 $cm^3$ in den Tauchtrog gefüllt. Ist er zu voll, so besteht die Gefahr, daß beim Senken des Tauchzylinders die Flüssigkeit überläuft.

Die Teströhre wird zwischen Prisma *5* und Würfel *11* gesetzt und nun muß durch Drehen der Zahnradschraube der Tauchzylinder solange gesenkt werden, bis Farbengleichheit des inneren Kreises mit dem umgebenden Ring eintritt. Haben wir vor dem Versuch oder im Laufe desselben den Tauchzylinder soweit gesenkt, bis sich der Tauchtrog und Tauchzylinder berühren und den Stand des Nonius als Nullpunkt für den jeweiligen Versuch notiert, so ist diese Zahl von der abgelesenen Höhe bei Farbengleichheit zu subtrahieren, um die wahre Schichtdicke zu bekommen. Lesen wir z. B. 32·6 *mm* bei Farbengleichheit ab, und der Nonius zeigte bei völliger Berührung der Platten des Tauchtroges und Tauchzylinders 0·3 *mm*, so ist die Schichtdicke, bei welcher wir Farbengleichheit mit der Farbe der Teströhre erzielen, 32·6 — 0·3 = 32·3 *mm*.

Der Chromophotometer ist so empfindlich, daß zwischen verschiedenen Ablesungen kaum mehr als 0·2 *mm* Abweichungen vorkommen. Das durch Mikroskop, Polarisationsapparate etc. optisch geschulte Auge braucht keine besondere Übung, um ganz genau auf Farbengleichheit einstellen zu können.

Genauigkeit des Apparates. Wie ich mich selbst überzeugt habe, ist der Apparat außerordentlich angenehm in der Handhabung und ermüdet das Auge nicht stark. Es empfiehlt sich, wie erwähnt, die Lichtquelle gut zu verdecken und seitlich einfallende Strahlen vollkommen abzublenden. Die Einstellung ist auf 0·1 *mm* genau, wenn auch bisweilen Abweichungen bis zu 0·3 *mm* nicht zu vermeiden sind. Diese Abweichungen bedeuten naturgemäß für verdünnte Lösungen einen geringeren Fehler als für konzentriertere.

### 4. Das Spektrophotometer von *Hüfner*.

Die Spektrophotometrie gibt, wie bekannt, ein physikalisch richtiges Maß der Absorptionsverteilung. Sie ist von *Vierordt*, dann von *Hüfner* zum Zwecke der Blutfarbstoffbestimmung ausgebildet worden.

*Vierordts* Methode besteht darin, die Helligkeit einer beliebigen Spektralregion durch Spaltverengerung so weit abzuschwächen, bis sie genau gleich der Helligkeit derselben Region eines durch die nämliche Lichtquelle erzeugten Absorptionsspektrums ist.

Die durch Absorption bewirkte Schwächung der Intensität des durchgelassenen Lichtes, in Bruchteilen der Intensität des auffallenden Lichtes ausgedrückt, ist bei gleicher Dicke und Konzentration der absorbierenden Schicht

immer dieselbe, gleichviel ob das auffallende Licht stark oder schwach ist. Je dicker die durchstrahlte Schicht oder je konzentrierter die Lösung, desto stärker wird die Absorption des durchgehenden Lichtes. Der reziproke Wert der Schichtdicke ist demnach ein Maß für die lichtschwächende Kraft der Substanz. Man nennt nach *Bunsen* den reziproken Wert jener Schichtdicke, welche das Licht durchstrahlen muß, um auf ein Zehntel seiner ursprünglichen Intensität abgeschwächt zu werden, den Extinktions- oder Absorptionskoeffizienten. Ist J die Intensität des auffallenden Lichtes, J' die Intensität des durchgelassenen Lichtes und c die Dicke der Schicht, dann ist

$$J' = J \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c} \quad \text{oder} \quad \varepsilon = \frac{1}{c}\left(\log \frac{J}{J'}\right)$$

Ist $c = 1\,cm$ und $J = 1$ angenommen, wie im vorliegenden Fall, so wird $\varepsilon = -\log J'$. Somit liefert die Messung der Intensität des nach der Durchstrahlung einer 1 *cm* dicken Schicht übrig bleibenden Lichtes einer bestimmten Spektralregion den Extinktionskoeffizienten für diese Region.

Da die Schwächung, welche das Licht bei Durchstrahlung einer Schicht von bestimmter Dicke erleidet, in demselben Verhältnis auch bei Durchgang durch eine zweite und dritte Schicht von gleicher Dicke stattfindet, und der Koeffizient der Lichtschwächung denselben Wert zeigen muß bei doppelter Dicke der Schicht und einfacher Konzentration wie bei einfacher Dicke und doppelter Konzentration, so ist das Absorptionsvermögen, oder mit anderen Worten der Extinktionskoeffizient der Konzentration der Lösung direkt proportional. Dabei ist allerdings die Voraussetzung gemacht, daß der Farbstoff sich bei Änderung der Konzentration nicht verändert. Ist c die in einem gegebenen Volumen vorhandene Gewichtsmenge des Farbstoffs, $\varepsilon$ der Extinktionskoeffizient, c' eine andere Gewichtsmenge desselben Farbstoffs in demselben Volumen und $\varepsilon'$ der entsprechende Extinktionskoeffizient, so ist

$$\frac{c^1}{\varepsilon^1} = \frac{c^2}{\varepsilon^2} = \frac{c^3}{\varepsilon^3} \ldots\ldots = \text{konst.}$$

Nach *Vierordt* heißt die Konstante

$$A = \frac{c}{\varepsilon} \text{ oder } A' = \frac{c'}{\varepsilon'}$$

das Absorptionsverhältnis. Kennt man sie, so kann man durch die Bestimmung von $\varepsilon$ oder $\varepsilon'$ die Konzentration der Farbstofflösung ermitteln.

*Hüfner* hat manche Unbequemlichkeiten und die Fehler des *Vierordt*schen Spektrophotometers vermieden. Anstatt die Spaltbreite zu verändern, läßt er auf die eine Hälfte des Kollimatorspaltes eines Spektroskops, hinter dem ein Prisma („*Albrecht*scher Körper") mit seiner horizontalen Kante senkrecht zum Spalt steht, durch ein Nicol linear polarisiertes, auf die andere Hälfte nichtpolarisiertes Licht fallen. Das polarisierte Licht passiert

eine 1 *mm* dicke, das nicht polarisierte eine 11 *mm* dicke Schicht der Blutlösung. Beide Strahlenbündel fallen auf das zweite, das analysierende Nikol.

Stehen die Hauptschnitte beider Nikols parallel zueinander, so geht das linear polarisierte Licht ungeschwächt hindurch. Es sollen in dieser Stellung ohne absorbierende Lösung beide Gesichtshälften genau gleich hell sein. Da von den zwei Strahlenbündeln das eine zwei, das andere nur ein Nikol passiert, nahm *Hüfner* an, er müsse den geringen Lichtverlust durch Einschaltung eines Rauchquarzkeiles in den zuletzt genannten Strahlengang ausgleichen. *Butterfield*[1]) glaubt neuerdings, diese Kompensation einer etwaigen Ungleichheit, die bei Parallelstellung der Nikols gemacht wird, gelte nicht bei der zur Messung der Absorption gebrauchten Stellung, wenn die Nikols gedreht sind. Dagegen sei das Lichtextinktionsvermögen des Rauchquarzes bei verschiedenen Wellenlängen verschieden und verändere so den Wert des Extinktionskoeffizienten. Man solle den Rauchquarzkeil fortlassen.

Dreht man das analysierende Nikol, so kann man die Intensität des polarisierenden Lichtbündels so weit abschwächen, daß sie gleich der des durch die absorbierende 11 *mm*-Schicht gegangenen Lichtes wird.

Die Farbstofflösung befindet sich in einer Glaskammer, deren planparallele Wände genau 11 *mm* voneinander entfernt sind und deren untere Hälfte von einem Glasklotz, dem *Schultz*schen Körper, ausgefüllt ist, dessen Dicke genau 10 *mm* beträgt. Die Flüssigkeit bildet also in der oberen Hälfte eine 11 *mm*, in der unteren eine 1 *mm* dicke Schicht und die Absorptionskraft der oberen im Vergleich zur unteren entspricht der einer 10 *mm* dicken Schicht.

## Berechnung des Extinktionskoeffizienten.

Es falle bei gleicher mittlerer Verdunkelung beider Gesichtshälften das einfallende polarisierende Licht $MA$ im Winkel $\varphi$ auf den Hauptschnitt $MB$ des analysierenden Nikols. Es wird in 2 Teile zerlegt, von denen nur das im Hauptschnitt des Analysators schwingende hindurchgelassen wird. Die Intensität dieses Teiles $(J')$ ist gleich $\cos^2\varphi$.

Da nach obiger Gleichung $\varepsilon = -\log J'$,

wird $\varepsilon = -\log \cos^2\varphi$.

Beispiel: Ablesungen. Die Zahlen bedeuten Drehungswinkel des analysierenden Nikols bis zur Helligkeitsgleichheit.

| $s = 16{\cdot}6$, $k = 1{\cdot}2$, $o = 0{\cdot}5$ | Kaninchenblut aus Carotis 1:100 Sodalösung | 22. VI. 04 | $s_{,} = 18{\cdot}9$, $k = 1{\cdot}2$, $o = 0{\cdot}5$ |
|---|---|---|---|
| 66·2 | 66·7 | 75·0 | 75·0 |
| 66·4 | 66·2 | 75·2 | 75·4 |
| 66·1 | 66·1 | 75·6 | 74·8 |
| 66·3 | 66·1 | 75·5 | 74·7 |
| 66·4 | 66·5 | 75·1 | 75·2 |
| Mittel: 66·28 | 66·32 | 75·28 | 75·02 |
| $\varphi = 66{\cdot}30$ | | $\varphi = 75{\cdot}15$ | |

[1]) *E. E. Butterfield*, Über Lichtextinktion des Blutfarbstoffs. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **62**. S. 173 (1909).

Es bedeutet hierbei $o$ die Öffnung des Okularschiebers (= 11 Wellenlängenausschnitt aus dem Spektrum), $k$ den Stand des Rauchquarzkeiles, $s$ den Stand der Kreissektorskala, mit dem das Fernrohr um das Dispersionsprisma gedreht wird und bestimmte Teile des Spektruns ins Gesichtsfeld gerückt werden.

Vor Aufstellung des Apparates in einem Dunkelzimmer auf einem Tisch, an dem man bequem mit dem Ellbogen aufgestützt in Ruhe ablesen kann (Skizze der Aufstellung Fig. 257), sind die den *Fraunhofer*schen Linien *D, E, b, F* entsprechenden Nummern dieser Skala bestimmt worden. Man trägt in einem Ordinatensystem als Abszissen die Sektorskalenteile, als Ordinaten die Wellenlängen auf, bezeichnet die den Linien entsprechenden

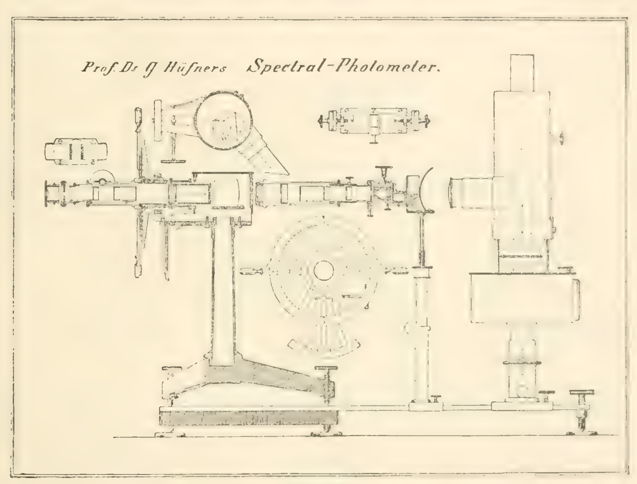



Fig. 257.

Punkte und interpoliert geradlinig zwischen *D* und *E*. Dann teilt man auf dieser die Wellenlängen

$\lambda = 565 — 554$ ab als Bezirk zur Bestimmung von $\varphi$

$\lambda_1 = 542{\cdot}5 — 531{\cdot}5$ „ „ „ „ „ „ $\varphi_1$.

Man zieht Ordinaten durch die obigen Wellenlängenpunkte und findet so auf der Abszissenachse die Sektorskalenteile, zwischen denen nach *Hüfner* untersucht werden soll. Für unseren Apparat sind die Mitten dieser Bezirke gerade eingestellt, wenn die Skala auf 16·6 für $\varphi$, auf 18·9 für $\varphi_1$ steht ($\lambda = 565 — 554$ und $542{\cdot}5 — 531{\cdot}5$ $\mu\mu$). Im Blutspektrum sind es Regionen in der Gegend des Absorptionsminimums zwischen den zwei sichtbaren Streifen und des Absorptionsmaximums im β-Streifen.

Neuerdings soll der Bezirk statt 11 nur noch 8·5 Wellenlängen betragen. Der Okularspalt muß dann enger sein.

In diesen zwei Bezirken werden je 10 Ablesungen der Drehungswinkel gemacht, nachdem man sicher ist, daß der Apparat genau horizontal steht (Wasserwage!). Es wird neuerdings empfohlen[1], eine Milchglasscheibe zwischen Lampe und Kästchen zu schalten, um sonst unvermeidbare Ungleichheiten der Beleuchtung im oberen und unteren Teil des Gesichtsfeldes zu umgehen. Der Eintrittsspalt (nahe dem Absorptionskästchen) soll $^1/_{40}$ *mm* genau betragen. Schon kleine Änderungen verändern bei weißem Licht infolge größerer Unreinheit des Spektrums die Werte von $\varphi$ und $\varphi_,$ sehr bedeutend. Den Rauchquarzkeil soll man, wie gesagt, ganz fortlassen.

Berechnung:

| | |
|---|---|
| $\varphi = 66{\cdot}30$ | $\varphi_, = 75{\cdot}15$ |
| $\log\cos\varphi$[1]) $= 0{\cdot}60417-1$ | $\log\cos\varphi_, = 0{\cdot}40873-1$ |
| $\log\cos^2\varphi = 0{\cdot}20834-1$ | $\log\cos^2\varphi_, = 0{\cdot}81746-2$ |
| $\varepsilon_0 = -\log\cos^2\varphi = 0{\cdot}79166$ | $\varepsilon_0' = -\log\cos^2\varphi_, = 1{\cdot}18254$ |

$$\frac{\varepsilon_,}{\varepsilon} = \frac{1{\cdot}18254}{0{\cdot}79166} = 1{\cdot}494.$$

Die Konzentration c der Lösung $= A_0 . \varepsilon_0 = A_0' . \varepsilon_0'$.

$A_0$ und $A'$ sind Konstanten, die unter Annahme (!) konstanter Trockensubstanz oder von 0·34% Fe auf 100 kristallisierten Farbstoff für genuinen Blutfarbstoff durch Aichung mit Hämoglobinkristallen zu ermitteln sind. Da $A = \frac{c}{\varepsilon}$ und $\varepsilon$ von dem Lichtverlust im Apparat abhängt, sind die Werte von A für jedes Spektrophotometer etwas verschieden.

*Hüfner* hatte bei Rinderhämoglobinkristallen und Trockensubstanzbestimmung gefunden: $A_0' = 0{\cdot}001312$ im Mittel von 8 Analysen mit 6% maximaler Differenz vom Mittelwerte.

Die Konstanten A sind also nur unter Annahme eines konstanten und analogen Verhältnisses zwischen Färbekraft, Eisen und Trockensubstanz im Farbstoff des zirkulierenden Blutes wie der Hämoglobinkristalle zu benutzen. Glaubt man an diese Konstanz nicht, so ist die Aichung des Spektrophotometers, d. h. die Ermittlung von A und damit die Benutzung zur absoluten Hämoglobinbestimmung unmöglich (siehe S. 728).

Das Blut muß zur Untersuchung im Verhältnis von etwa 1:150 mit 0·1%iger Sodalösung verdünnt werden. Es ist besonders darauf zu achten, daß sowohl die Lösung, wie die das Absorptionskästchen abschließenden Glasflächen tadellos staubfrei sind. Schon leichte Trübungen bedingen, gerade bei dieser Methode, sehr erhebliche Fehler. Ferner muß darauf geachtet werden, daß der Apparat in einem Dunkelzimmer vollkommen horizontal und vor Erschütterungen geschützt aufgestellt wird, daß die Auerlampe in genau gleicher Höhe steht wie das den Kollimatorschieber und den *Albrecht*schen „Glaskörper" tragende Rohr, daß das Dispersionsprisma so fest steht, daß es sich nie verschieben kann und endlich, daß der das Absorptionskästchen mit

[1]) *Dr. C. Bremikers* Logarithmentafeln. Weidmannsche Buchhandlung, Berlin (1899). Tafeln der Logarithmen der trigonometrischen Funktionen für jedes Hundertstel des Grades des Quadranten.

der Blutlösung tragende Messingrahmen scharf anschließend vor dem Ende des Kollimatorrohres und genau vertikal aufgestellt wird. Wenn die obere Grenzfläche des *Schultz*schen Körpers, die obere Fläche des äußeren Nikols, die brechende Kante des Dispersionsprismas nicht genau in der gleichen Ebene liegen, so sind die beiden als rötlich gefärbte vertikale Streifen wirkenden Hälften des Gesichtsfeldes nicht durch eine fast unsichtbare Trennungslinie getrennt, sondern es zeigen sich mehrere derartige Linien oder oberhalb oder unterhalb derselben ungleichmäßig gefärbte Stellen. In diesem Falle ist eine genaue Ablesung unmöglich.

Der Spektrophotometer erfordert ein erhebliches Maß von Exaktheit und Vorsicht beim Arbeiten und außerdem große Ruhe des Beobachters. Es ermüdet die Augen stark. *Hüfner* selbst hat oft genug betont, daß man nur dann, wenn man sich vollkommen ruhig und nicht nervös fühlt, richtig ablesen kann. Es ist also ein empfindliches Instrument. So sagt der letzte Autor, der damit gearbeitet hat[1]): „Die primitive Beleuchtungsvorrichtung, die unpassende Form des Absorptionsgefäßes sowie die erheblichen Schwierigkeiten bei der raschen und sicheren Einstellung auf gleiche Helligkeit der beiden Gesichtsfelder haben uns dazu geführt, Abstand von dem Gebrauch des *Hüfner*schen Spektrophotometers zu nehmen und weitere Versuche nur noch mit dem Apparat von *König*, *Martens* und *Grünbaum* anzustellen."

Danach dürfte schwerlich jemand noch den Mut haben, das *Hüfner*sche Instrument bloß für Blutfarbstoffbestimmungen zu benutzen.

Für relative Hämoglobinwerte ist es zweifellos recht genau, doch meines Erachtens nicht genauer als der *Miescher*sche Hämometer, das Keilhämometer u. a. Für Bestimmungen der absoluten Hämoglobinwerte gilt, wie gesagt, dasselbe, was beim *Miescher*schen Apparat auf S. 728 gesagt worden ist.

### Die sogenannte objektive Hämoglobinometrie.

*Plesch*[2]) hatte den ingeniösen Gedanken, die Eigenschaft des Selens, seine elektrische Leitfähigkeit bei verschiedener Belichtung zu ändern, für eine Bestimmung der Absorptionskraft von Blutfarbstofflösungen herauszuziehen. Zur Messung dient ein Spiegelgalvanometer mit Fernrohrablesung. Zur Untersuchung bringt man, nachdem das Galvanometer bei voller Belichtung der Selenzelle auf den Mittelpunkt einer Skala eingestellt ist, eine Standardlösung (entweder Hämoglobin oder Kohlenoxyd-Hb) vor die Selenzelle und liest den Ausschlag des Galvanometers ab. Darauf verfährt man in gleicher Weise mit der zu untersuchenden Lösung. Es verhalten sich dann die Ausschläge direkt proportional der Konzentration resp. der Absorptionskraft. *Plesch* hat bisher nur die Idee dieser Messung gegeben, sie aber noch nicht zu einer allgemeinen brauchbaren Methode ausgearbeitet. Es fragt sich daher noch, inwieweit sie praktisch verwendbar ist.

---

[1]) *E. E. Butterfield,* Über Lichtextinktion des Blutfarbstoffs. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 62. S. 173 (1909).

[2]) *J. Plesch,* Objektive Hämoglobinometrie. Biochem. Zeitschr. Bd. 1. S. 32 (1906).

# Die Bestimmung des spezifischen Gewichtes, der Trockensubstanz und der Viskosität des Blutes.

Von **Franz Müller**, Berlin.

## 1. Bestimmung des spezifischen Gewichtes.

Schwankungen in der Dichte des Gesamtblutes geben einen Maßstab für Änderungen der Blutkörperzahl, da diese die Dichte, wenn auch nicht ausschließlich, so doch im wesentlichen bedingt. Die Dichte des Serums dagegen ist viel stabiler, sie kann aber unter gewissen Umständen, bei erheblichen Änderungen des Wassergehalts des Blutes von Interesse sein.

### 1. Pyknometrische Methode.

Hat man ausreichend Blut zur Verfügung und stört es nicht, das Blut vor der Bestimmung zu defibrinieren, so verwendet man 2—3 *cm*³ fassende Glaskölbchen. Sie werden durch ein eingeschliffenes, etwa 2 *cm* langes Kapillarrohr verschlossen. Man füllt das Blut so ein, daß es den Kolben luftfrei erfüllt und über dem Schliff eine Kuppe bildet, dann drückt man das abschließende Kapillarrohr auf, so daß das Blut die Kapillare erfüllt und reinigt vor der Wägung das Kölbchen von außen. Für sehr genaue Messungen hat man Pyknometer mit Thermometern, die die Temperatur des Blutes anzeigen. Das Gewicht des Pyknometergefäßes ist sowohl in leerem trockenen Zustand wie mit destilliertem Wasser gefüllt bekannt. Die Wägung in blutgefülltem Zustand ergibt dann durch einfache Rechnung das spezifische Gewicht.

Hat man nur einen Blutstropfen zur Verfügung und will das Defibrinieren vermeiden, so saugt man das Blut nach dem Vorgehen von *Schmaltz*[1]) in ein Kapillarpyknometer. Diese stellen etwa 10—12 *cm* lange Glasröhrchen von etwa 1 *mm* lichter Weite dar, die an ihren beiden Enden zu noch engeren Kapillaren ausgezogen sind. Die reinen trockenen Röhrchen werden leer, dann mit destilliertem Wasser gefüllt, gewogen. Nach nochmaliger Trocknung füllt man sie mit Blut und wägt wieder. Die sehr ein-

---

[1]) *R. Schmaltz*, Die Untersuchung des spezifischen Gewichts des menschlichen Blutes. Arch. klin. Med. Bd. **47**. S. 145 (1890).

fache und sehr geringe Mengen Blut erfordernde Methode gibt, sauberes Arbeiten vorausgesetzt, sehr gute Resultate.

### 2. Aräometrische Methode.

Dieses indirekte Vorgehen beruht darauf, daß man kleine Blutstropfen in Lösungen von verschiedenem spezifischen Gewicht bringt, in denen sie sich nicht auflösen, sondern ihre Kugelform behalten. Man probiert durch Veränderung des spezifischen Gewichts, in welcher Mischung einer leichteren und einer schwereren Flüssigkeit der Blutstropfen gerade schwebt und bestimmt dann aräometrisch das spezifische Gewicht dieser Mischung. Am meisten gebraucht wird nach dem Vorgehen von *Hammerschlag*[1]) die Mischung von Chloroform und Benzol. Bei ihr muß man nur ziemlich schnell arbeiten und wenn man durch Ausprobieren schließlich die richtige Mischung gefunden zu haben glaubt, die Bestimmung sofort in dieser Mischung nochmal wiederholen. Notwendig ist auch, daß man schon von vornherein verschiedene Mischungen von Chloroform und Benzol bereit hält.

Im allgemeinen geben solche indirekten Bestimmungen durchschnittlich höhere Werte als die direkten. Die richtige Mischung ist auch nicht immer leicht zu erkennen, da bisweilen einige Tröpfchen aufsteigen, andere sich gleichzeitig senken.

## 2. Bestimmung der Trockensubstanz des Blutes.

Genauer und meist einfacher als die Bestimmung des spezifischen Gewichts ist die Bestimmung der Trockensubstanz des Blutes, allerdings nur dann, wenn man genügende Blutmengen zur Verfügung hat.

Man läßt das Blut in mittelgroße Wägegläschen mit eingeschliffenen Stopfen direkt aus dem Blutgefäß einfließen (etwa 5 *cm*³) und trocknet im Trockenschrank bei 105°, bis Gewichtskonstanz erreicht ist, d. h. bis die Werte nicht mehr als höchstens 1 *mg* differieren.

## 3. Bestimmung der Viskosität des Blutes.

### 1. Prinzip der Methoden.

Je größer die innere Reibung einer Flüssigkeit, um so schwerer ist sie durch eine Kapillare zu pressen. Die Menge v, die durch eine gerade Kapillarröhre vom Radius r, der Länge l in der Zeit t beim Druck p fließt, ist nach dem *Poiseuille*schen Gesetz:

$$v = \frac{\pi . p . t . r^4}{8 \varphi . l}$$

$\varphi$ ist dabei die Viskosität der Flüssigkeit. Für eine bestimmte Flüssigkeit und eine bestimmte Kapillare ist daher die durchgeflossene Menge um so größer, je größer der Druck oder, wenn der Druck gleich bleibt, je

[1]) *Hammerschlag*, Über eine neue Methode zur Bestimmung des spezifischen Gewichts des Blutes. Wiener klin. Wochenschr. S. 1018 (1890).

länger die Durchflußzeit. Man kann daher, wenn man die Viskosität einer Flüssigkeit bestimmen will, bei gleichbleibendem Druck und bestimmter Kapillare entweder eine konstante Flüssigkeitsmenge durch die Kapillare hindurchpressen oder saugen und die Zeit bestimmen, oder man bestimmt die während einer konstanten Zeit durchgeflossenen Flüssigkeitsmengen. Das erste ist in dem nach *Ostwald*schem Prinzip angeordneten Apparat von *Hirsch* und *Beck*[1]) so wie in dem vereinfachten von *Determann*[2]) durchgeführt, das zweite bei den Messungen in den Apparaten von *Heß*[3]) und dem danach modifizierten von *Münzer-Bloch*.[4])

Man bestimmt bekanntlich immer nur den relativen, nicht den absoluten inneren Reibungskoeffizienten, d. h. den Wert der inneren Reibung des Blutes, bezogen auf Wasser als Einheit.

Es sollen im folgenden nur die leichter anwendbaren Methoden besprochen werden, während die kompliziertere ältere von *Hürthle*[5]), der das Blut direkt aus der Arterie des Tieres durch eine geaichte Kapillare fließen ließ, hier wegbleiben kann.

## 2. Der Apparat von Hirsch und Beck.[6])

Durch ein Doppelgebläse wird der Druck erzeugt, um das Blut durch die Kapillare zu pressen. Der Luftstrom aus dem Gebläse passiert ein Chlorcalciumrohr, dann eine mit Filz umgebene Druckflasche von etwa 2 *l* Inhalt, weiter eine T-Teilung: ihr einer Schenkel führt zu einem mit Benzol gefüllten Manometer, ihr anderer vermittelst längeren Gummischlauches zu dem eigentlichen Viskosimeter. Dieses wird für die Untersuchung in einen *Ostwald*schen Wasserthermostaten von 38° versenkt. Der Viskosimeter ist mit besonderer Berücksichtigung der für das leicht gerinnende Blut erforderlichen schnellen Füllung und Reinigung etwas anders konstruiert als die *Ostwald*schen Viskosimeterröhren. Die Kapillare von 0·25—0·35 *mm* Durchmesser und etwa 10 *cm* Länge mündet oben in eine Erweiterung, deren Inhalt etwa $^1/_2$ $cm^3$ beträgt und die sich weiter nach oben wieder verengt. An der oberen Mündung ist ein Ansatzstück für den von der Druckflasche kommenden Gummischlauch, unten geht die Kapillare über in

[1]) *C. Hirsch* und *C. Beck*, Eine Methode zur Bestimmung des inneren Reibungswiderstandes des lebenden Blutes beim Menschen. Münchener med. Wochenschr. Bd. 47. S. 1685 (1900).

[2]) *Determann*, Ein einfaches, stets gebrauchsfertiges Blutviskosimeter. Münchener med. Wochenschr. Bd. 54. S. 1130 (1907).

[3]) *W. Heß*, Die Bestimmung der Viskosität des Blutes. Münchener med. Wochenschr. Bd. 54. S. 1590 u. 2225 (1907).

[4]) *E. Münzer* und *F. Bloch*, Die Bestimmung der Viskosität des Blutes. Med. Klinik. Nr. 9—11 (1909).

[5]) *K. Hürthle*, Über eine Methode zur Bestimmung der Viskosität des lebenden Blutes. *Pflügers* Arch. Bd. 82. S. 415 (1900).

[6]) Der Apparat wird von F. Köhler, Leipzig, Institut für angewandte Chemie, komplett geliefert.

ein U-förmiges erweitertes Rohr, das sich kugelförmig noch mehr erweitert, und das ein vermittelst Schliffes aufgepaßtes langes, etwa 3 *mm* weites Verschlußrohr trägt. Der ganze Viskosimeter sitzt senkrecht in einem Halter mit Stativ. Der Versuch wird so ausgeführt, daß man in der Druckflasche einen Druck von 80 *cm* Wasser = 45·2 *cm* Benzol herstellt und das luftdicht schließende System durch einen Quetschhahn abschließt. Darauf bringt man einige Tropfen Blut in die kugelige Erweiterung des Viskosimeters, saugt das Blut durch die Kapillare hindurch in die obere Erweiterung, setzt das Verschlußrohr auf, verbindet den Viskosimeter mit der Druckflasche, stellt das Stativ in den Thermostaten und läßt nun durch den Druck von 40 *cm* Wasser das Blut durch die Kapillare hindurchpressen. Sie besitzt oben und unten eine Marke; die Zeit, welche das Blut braucht, um die Marke zu passieren, wird mittelst Stoppuhr registriert. Diese Messung kann mehrmals wiederholt werden, bis die ersten Gerinnsel Störungen verursachen. Hat man auf die Stelle, von der das Blut entnommen wurde, einige Körnchen Hirudin gebracht und so die Gerinnung verhindert, so läßt sich die Messung mit dem Hirudinblut beliebig oft wiederholen. Die Viskosimeter werden am besten mit frisch destilliertem Anilin, nicht mit Wasser geaicht, da Anilin ein dem Blut sehr ähnliches spezifisches Gewicht besitzt.

### 3. Der Apparat von Determann.

Zweifellos sehr viel einfacher, wenn auch wohl weniger genau, ist die *Determann*sche Anordnung. In ihr ist auf die Verwendung eines Thermostaten und eines bestimmten Druckes verzichtet. Das Blut fließt durch die eigene Schwere durch eine Kapillare, die sich in senkrechter Stellung in einem Wassermantel von konstanter Zimmertemperatur befindet. Dieser aus Glas gefertigte Mantel läßt sich in 2 Gabeln eines Gestelles um 180° drehen, so daß das untere Ende dann zu oberst kommt.

Das aus dem Ohrläppchen gewonnene, mit etwas Hirudin am Ort der Entnahme sofort vermischte Blut wird bis zu einer Marke am Ende der Erweiterung über der Kapillare angesaugt und die Durchflußzeit in senkrechter Stellung gemessen, darauf gedreht und der Versuch von der anderen Seite wiederholt. Es wird nur 0·1 *mm* Blut gebraucht und die Kapillare soll sich auch leicht reinigen lassen.[1])

### 4. Der Apparat von Heß.[2])

Auf einer Milchglasplatte sind zwei graduierte Glasröhrchen befestigt, die auf der einen Seite durch ein Verbindungsrohr mit Ansatzstutzen mit einem Gummiballon in Verbindung stehen, während sie auf der anderen Seite in 2 Kapillaren auslaufen. Diese erweitern sich am Ende zu Glasröhren vom

---

[1]) Der Apparat von *Determann* bei B. B. Cassel, Frankfurt a. M., erhältlich.

[2]) Der Apparat von *Heß* erhältlich bei J. G. Kramer, Glasbläserei, Zürich, I., Spiegelgasse 7.

Kaliber der genannten graduierten Röhren. Das eine dieser Endröhrchen sitzt nur locker an der Kapillare und kann durch ein anderes gleiches leicht ersetzt werden. Es dient zur Aufnahme des Blutes. Vor dem Gummiballon ist ein Glasrohr mit kleiner, seitlicher Öffnung eingeschaltet.

In der einen der Kapillaren nebst ihren Erweiterungen befindet sich soviel destilliertes Wasser, daß gerade der graduierte Teil bis an die Marke heran gefüllt ist. Das Blutröhrchen wird durch Kapillarstück mit dem Blutstropfen gefüllt, mit der zweiten Kapillare in Verbindung gebracht und das Blut durch Ansaugen vom Ballon her durch diese Kapillare bis an die 0-Marke der anschließenden Erweiterung angesaugt. Inzwischen ist die andere Kapillare durch einen zwischengeschalteten Hahn verschlossen. Der Hahn wird jetzt geöffnet und nunmehr durch die eine Kapillare Wasser, durch die andere das Blut vom Ballon her angesaugt. Sobald eine bestimmte Marke von dem Blut erreicht ist, wird die Seitenöffnung vor dem Ballon, die bisher durch einen Finger verschlossen war, freigegeben und der Stand des Blutes und des Wassers markiert. Darauf treibt man beides auf die 0-Stellung zurück und wiederholt die Messung, eventuell unter Ersatz des Blutröhrchens durch ein gleiches, das mit frisch entnommenem Blut wieder gefüllt war. Da Steigen der Temperatur um 1° den Wert nur um 0·8% verringert und bei der gewöhnlichen Temperatur vorgenommene Versuche höchstens einen Fehler von 4% durch Schwanken der Temperatur erleiden, wurde diese nur bei extremen Abweichungen berücksichtigt. Bei 37° waren die Blutwerte durchschnittlich 16% niedriger als bei 17°.

## 5. Der Apparat von Münzer-Bloch.[1])

Die genannten Autoren vermißten bei dem *Heß*schen Viskosimeter eine Gewähr dafür, daß die beiden Kapillaren genau die gleiche Temperatur besitzen. Außerdem schienen die Kapillaren noch zu weit und bei dickem Blut zu kurz, um genügend lange beobachten zu können. Endlich ist der Apparat ihrer Ansicht nach schlecht zu reinigen; sie veränderten ihn in folgender Weise:

Die 2 Kapillaren sind 9 *cm* lang und nur $^3/_{1000}$ *cm* weit. Sie erweitern sich nach beiden Seiten, und zwar ist die eine Seite bei dem einen Rohr länger als bei dem anderen. Die andere Seite ist bei der für das Wasser dienenden Kapillare etwa 1 *mm*, bei der mit Blut zu füllenden etwa $^1/_2$ *mm* weit. Die beiden Ansatzstücke sind in gleicher Weise graduiert.

Die Röhren sind im ganzen etwa 25 *cm* lang und liegen genau horizontal in einem Glasmantel, der mit Wasser gefüllt wird und in dem sich ein Thermometer befindet.

Die graduierten Röhren laufen außerhalb des Wassermantels in mit Hähnen versehene Röhren aus. Diese vereinigen sich zu einem **T**-Rohr.

[1]) Erhältlich bei Universitäts-Glasbläser Grünwald, Prag, chemisches Institut der deutschen Universität.

das eine Seitenöffnung mit Quetschhahn besitzt. Das **T**-Rohr selbst führt einerseits zu einem Manometer, andrerseits zu einem Gummiballon.

Man füllt zunächst beide Schenkel des **U**-förmigen Rohres bis zum 0-Punkt der Teilung mit destilliertem Wasser, saugt dies vom Ballon her an und bestimmt den Stand gleichzeitig in beiden graduierten Röhren. Da die durch beide Kapillare durchgesaugten Wassermengen gleich groß sind, so muß die Länge der Wassersäulen in den beiden graduierten Röhren das Verhältnis des Inhalts beider angeben. Es beträgt etwa 2. Nun wird in die zu dem engeren Rohr gehörige Kapillare der Blutstropfen eingesaugt, beiderseits Wasser und Blut auf die 0-Stellung gebracht und wiederum vom Ballon her angesaugt. Es verhalten sich dann die Viskositäten der beiden Flüssigkeiten umgekehrt wie die durchgesaugten Flüssigkeitsmengen. Die Viskosität des Blutes ist also gleich der Länge der Wassersäule dividiert durch die Länge der Blutsäule multipliziert mit dem zuvor empirisch gefundenen Quotienten des Inhalts beider Röhren.

## 6. Die Genauigkeit der Resultate.

Nach *Hirsch* und *Beck* beträgt die Abweichung in den einzelnen Messungen 0·2—0·4 Sek. Der Fehler wird naturgemäß bei kürzerer Durchlaufszeit, d. h. dünnerem Blut, höher als bei dickerem.

Nach *Heß* betrug der größte Unterschied verschiedener Messungen an einer und derselben Person 3% und die größte Abweichung vom Mittelwert 2% (z. B. 4·22 und 4·35, Mittel 4·26). Änderungen der Temperatur bedingen, wie erwähnt, pro 1° etwa 0·8% (Normalwert bei 17°). Viel beträchtlicher werden Abweichungen, die durch Stauung oder lokale Anregung der Zirkulation bei der Blutentnahme künstlich hervorgerufen werden.

Schwankungen bis zu 8% des Wertes sind keine Seltenheit.

Merkwürdig und noch unerklärt ist, daß die Werte für die innere Reibung des Blutes nicht in allen Apparaten die gleichen sind, so fanden *Münzer* und *Bloch* in Parallelbestimmungen:

| Apparat von | Anilin | Blut mit Hämoglobingehalt von Prozent | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 30 | 50 | 80 | 80 | 90 | 90 | 100 | 105 | 110 |
| *Determann* . . . | 4·1 | 2·4 | 3·3 | 5·3 | 4·6 | 5·4 | 7·0 | 5·8 | 6·6 | 8·6 |
| *Heß* . . . . . . | 4·25 | 2·9 | 3·7 | 4·3 | 4·6 | 5·2 | 6·1 | 4·2 | 5·6 | 6·7 |
| *Münzer* und *Bloch* | 4·0 | 2·8 | 3·2 | 4·3 | 4·6 | 4·9 | 5·6 | 4·9 | | |

Der *Determann*sche Apparat gibt also höhere Werte als die anderen, und zwar mit zunehmender Viskosität um so höhere.

# Die Bestimmung der Blutmenge.[1]

Von **Franz Müller,** Berlin.

## 1. Direkte Bestimmungsmethode der im Körper vorhandenen Blutmenge.

Will man die Gesamtmenge des im Körper eines Tieres vorhandenen Blutes ermitteln, so bedient man sich der *Welcker*schen Methode mit einigen von mir im Jahre 1901 angegebenen Modifikationen.[2] *Welckers* Methode beruht darauf, daß man das gewogene Tier verblutet und die Gefäße so lange mit warmer isotonischer Salzlösung bei erst selbständiger, dann künstlicher Atmung ausspült, bis das Spülwasser ungefärbt aus den Venen abläuft.

Man geht in folgender Weise vor: Das zuvor gewaschene, sorgfältig gereinigte Tier wird auf einem Operationsbrett in schwacher Narkose aufgebunden und möglichst schnell eine große Arterie am Halse oder am Bein sowie eine Vene am Hals ohne jeden Blutverlust(!) freigelegt. Die dabei verwendeten Tupfer werden gesammelt. Man führt Kanülen in beide Gefäße ein, läßt unter Rühren das Blut aus der Arterie oder mehreren großen Arterien in eine gemessene Menge einer Lösung von oxalsaurem Ammon und gleichzeitig in die Vene 0·9%ige warme Kochsalzlösung einfließen, und zwar reguliert man Ein- und Auslauf so, daß das Herz und die Atmung möglichst lange arbeiten. Das erreicht man am besten dadurch, daß man nach kräftigem Aderlaß die Arterien abschließt, Kochsalzlösung in etwa der gleichen Menge, wie Blut ausgeflossen, infundiert, einige Sekunden wartet und wieder entblutet. Bisweilen empfiehlt es sich, die Arterienkanülen zentral- und peripherwärts einzubinden. Sobald das Tier durch den Blutverlust bewußtlos und ruhig geworden ist (die Narkose hat schon früher aufgehört), müssen die um Kopf und Extremitäten gelegten Stricke entfernt und unter Massieren der Extremitäten und des Kopfes passive Bewegungen ausgeführt werden. Man beobachtet die bessere Ausspülung dieser peripherischen Gebiete sofort an zunehmender Röte der aus den

---

[1]) Vgl. die nach Abschluß des Manuskripts erschienenen hämodynamischen Studien von *J. Plesch,* Zeitschr. f. exper. Pathol. Bd. **6**. S. 380 (1909). Sie konnten nur noch teilweise bei der Korrektur berücksichtigt werden. Dort sind alle je verwendeten Methoden angegeben.

[2]) *Franz Müller,* Ein Beitrag zur Bestimmung der Gesamtblutmenge. Arch. f. Anat. u. Physiol. S. 459 (1901).

Venen ausfließenden Spülflüssigkeit. Wenn das Herz zu schlagen aufhört, schaltet man den Einlauf so um, daß die Salzlösung unter ca. 1 *m* Wasserdruck in die Arterien einläuft, während die Flüssigkeit jetzt aus den Venen oder dem rechten Herzen direkt ausströmt, und setzt die Spülung bei künstlicher Atmung und Herzmassage so lange fort, bis die Flüssigkeit nur noch schwach gelblich gefärbt ist und die Gewebe stark ödematös werden. Um Verluste zu vermeiden, steht das Operationsbrett auf einer Blechwanne, von der aus die überfließende Menge in einen Eimer oder großes Becken einläuft. Sollten sich in der Spülflüssigkeit Gerinnsel gebildet haben, so ist nach guter Durchmischung durch Gaze zu filtrieren. Die Gerinnsel werden mit 1%iger Sodalösung farbstofffrei extrahiert.

Man würde fehl gehen, wenn man glaubte, daß nunmehr der gesamte Blutfarbstoff des Körpers entfernt ist. Versuche[1]) ergaben, daß es im besten Fall 80% der Gesamtmenge sind. Um den Rest zu gewinnen, muß man das Tier enthäuten, die Muskeln von den Knochen abtrennen, Muskeln und Organe unter Entfernung der Gallenblase, des Harns, der Augen und des Darms nebst Inhalt (das Darmgewebe ist vollkommen farblos geworden) zerkleinern und auf Eis mit Wasser über Nacht (eventuell mit Toluol) stehen lassen. Bei kleineren Tieren gelingt es natürlich, den ganzen Vorgang schneller, in einigen Stunden, durchzuführen. Die Knochen werden klein zersägt, zerstoßen und auch mit Wasser angesetzt. Nach Abgießen dieser Auslaugeflüssigkeiten und Filtrieren durch Gaze werden Organe und Muskeln zusammen, andrerseits die Knochen für sich, mit Sand verrieben und in einer gut wirkenden *(Buchner-)*Presse ausgepreßt, noch 2- bis 3mal mit Wasser extrahiert und ausgepreßt. Die Muskeln müssen, im Mikrospektralapparat untersucht, frei von Blutfarbstoff sein. Man findet bei gesunden Tieren je nach der Güte der ersten Durchspülung 8 und 16% in Muskeln und Organen und einen Rest von 6—13% des Gesamtblutfarbstoffs in den Knochen.

Ganz anders kann die Verteilung bei kranken Tieren sein (siehe viertes Tier der folgenden Tabelle, selbst unter Berücksichtigung der infolge Herzschwäche schlechteren Ausspülung).

Beispiel: Hunde.[2])

| Bezeichnung | Vom Gesamthämoglobin Prozente in | | | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|
| | Blut | Organen | Knochen | |
| Schwarz | 75·5 | 16·3 | 8·2 | Eisenarme Kost |
| Schwarzweiß | 78·5 | 8·7 | 12·8 | Milch und Eisen |
| Gelb | 81·9 | 12·4 | 5·7 | Gemischtes Futter |
| Graugelb | 38·2 | 23·2 | 38·6 | Staupe |
| Weiß | 80·1 | 8·9 | 11·0 | Eisenarme Kost |
| Schwarzweiß | 83·2 | 7·6 | 9·0 | Milch und Eisen |

[1]) *Franz Müller*, Ein Beitrag zur Bestimmung der Gesamtblutmenge. Arch. f. Anat. u. Physiol. S. 459 (1901).

[2]) *Franz Müller*, l. c. und Beiträge zur Frage nach der Wirkung des Eisens bei experimentell erzeugter Anämie. *Virchows* Arch. Bd. **164**. S. 445 (1901).

Die Blutfarbstoffbestimmung in den Extrakten erfordert eine gewisse Übung, da man die aus fettartigen Stoffen bestehende Trübung auf jeden Fall vollkommen entfernen muß, ohne daß Blutfarbstoff durch die Klärung verloren wird. Mir hat sich entgegen den schlechten Erfahrungen anderer Autoren Zusatz von Baryumchlorid und Natriumoxalat mit darauffolgendem Zentrifugieren gut bewährt. Die Klärung gelingt aber gewiß auch mit anderen nicht stark adsorbierenden Niederschlägen. *Plesch* empfiehlt Zusatz von Spuren von Ammoniak und Filtration.

*Abderhalden*[1]) ist bei seinen Versuchen über die Assimilation des Eisens und über den Einfluß des Höhenklimas bei kleinen Tieren, wie Ratten, so verfahren, daß er nach eingetretenem Tode (durch Chloroform oder Äther), ohne zu durchspülen, das Fell vom Kinn bis zum After aufspaltete, unter Zurücklassen der Fettschicht mit der Hand loslöste, darauf Schwanz und hintere Extremitäten abschnitt. (Das Fell ist, wie ich mich auch selbst bei Versuchen mit Mäusen überzeugt habe, dann vollkommen blutleer.) Bei Hunden und Katzen muß man allerdings mit dem Messer bei der Enthäutung nachhelfen. Dann wurde der Darm sorgfältig entfernt, eventuell nach Abspülung und Entleerung des Inhalts für sich extrahiert oder auch extrahiert, während beide Enden fest verschlossen blieben. Vernachlässigt man das Darmblut, so begeht man (ohne Durchspülung!) bei Katzen oder Hunden Fehler von etwa 0·7% des Gesamthämoglobins. Der ganze Körper wurde dann fein zerkleinert oder zerhackt und mit Wasser auf Eis extrahiert. *Abderhalden* empfiehlt, die Eingeweide gesondert zu behandeln, da die Muskeln sonst leicht den aus den Eingeweiden ausgetretenen Farbstoff aufnehmen. Bildung von Blutgerinnseln wurde vermieden, um das mühsame Extrahieren zu umgehen. Es wurde so lange extrahiert, bis Zusatz des letzten Extraktes zu einer Hämoglobinlösung keine Änderung der Blutfarbstoffkonzentration mehr erzeugte. So benutzte er für 3 Monate alte Katzen etwa $^3/_4$ *l* mit 12stündiger Extraktion. Nach weiteren 12 Stunden Extraktion mit über $^1/_2$ *l* wurden noch etwa 25%, nach weiteren 12 Stunden mit $^1/_2$ *l* noch etwa 14% extrahiert. Die Zahl der notwendigen Extraktionen von je 24 Stunden betrug bei Ratten 2, bei Kaninchen, bei Meerschweinchen, Hunden und Katzen 2 für Muskeln und Knochen und 3 für Eingeweide, Erfahrungen, die mit den meinigen übereinstimmen.

Um vollkommen klare Extrakte zu erhalten, was natürlich für eine exakte Hämoglobinbestimmung unbedingt notwendig ist, wurde auf Eis filtriert, am besten unter Verwendung des Filterpapiers Nr. 591 von Schleicher & Schüll. Bisweilen senken sich auf Eis schon die Niederschläge zu Boden, so daß eine Filtration unnötig ist. Jedenfalls ist diese Klärungsmethode, wenn möglich, der durch Erzeugung eines künstlichen Niederschlages vorzuziehen.

---

[1]) *E. Abderhalden,* Assimilation des Eisens. Zeitschr. f. Biol. Bd. **39.** S. 197 und Über den Einfluß des Höhenklimas auf die Zusammensetzung des Blutes. Inaug.-Diss. Basel 1902.

Die Blutfarbstoffbestimmung in den Extrakten kann man mit einer der genauen, im Vorstehenden (S. 719 ff.) erwähnten Methoden vornehmen. *Abderhalden* benutzte einen kolorimetrischen Vergleich mittelstark konzentrierter Lösungen mit einer ähnlich starken Hämoglobinlösung (Kristalle) von bekanntem Gehalt und gleicher Farbennuance, d. h. bei Kaninchen und Ratten: Pferdebluthämoglobin, bei Katzen und Hunden: Hundebluthämoglobin. Die Hämoglobinkristalle wurden in verdünntem Alkohol (1 : 4) im Eisschrank aufbewahrt und in Glaströgen mit planparallelen Wänden in ihre Farbenintensität verglichen.[1]) Ich selbst verwende bis in die jüngste Zeit das *Fleischl-Miescher*sche Hämometer und bin im Gegensatze zu *Abderhalden* auch jetzt noch der Meinung, daß die Vergleichswerte zuverlässig sind, wenn man die Instrumente zuvor geeicht hat.[2]) Zu empfehlen ist auch das Chromophotometer.

## 2. Indirekte Bestimmungsmethoden der im Körper vorhandenen Blutmenge.

Methoden zur Bestimmung der Blutmenge im lebenden Tier haben außer der unvergleichlich größeren Einfachheit den Vorzug, daß dasselbe Tier mehrfach zu verschiedenen Zeiten untersucht werden kann, und daß wenigstens einige der Methoden auch beim Menschen anwendbar sind. Es darf aber nicht übersehen werden, daß bei allen diesen indirekten Methoden vielleicht nicht die gesamte im Körper vorhandene, sondern nur die in Zirkulation befindliche Blutmenge bestimmt wird. Das brauchen nicht identische Größen zu sein, aber für vergleichende Untersuchungen sowie für viele Fragen der menschlichen Pathologie genügt es, die zirkulierende Blutfarbstoffmenge zu kennen.

*a)* **Infusionsmethode.** Gelingt es beim Lebenden, das Blut durch eine bekannte Menge Flüssigkeit zu verdünnen, nachdem man zuvor eine kleine Blutprobe gewonnen hat, und eine zweite Blutprobe in einem Moment zu erhalten, in dem die ganze injizierte Flüssigkeitsmenge sich noch im Blutgefäßsystem, aber auch schon mit dem Blut vollkommen vermischt vorfindet, so ergibt ein Vergleich des Trockensubstanzgehaltes oder der Blutkörperchenzahl oder des relativen, prozentischen Blutfarbstoffgehalts oder des Verhältnisses von Blutkörperchen zu Plasma vor und nach der Infusion die zirkulierende Blutmenge. Es sei z. B. der Farbstoffgehalt der ersten Blutprobe, die m *cm*³ betrage, = a, der der zweiten = b, die Menge der infundierten Lösung = c, so verhält sich die Blutmenge x : (x + c) = b : a

$$x = \frac{b \cdot c}{a - b}.$$

Die Gesamtblutmenge ist = x + m.

[1]) Bezüglich der Exaktheit der Methode und Zersetzung des Blutfarbstoffs siehe *Abderhalden*, Zeitschr. f. Biol. Bd. **39**. S. 197.

[2]) *E. Abderhalden*, *Pflügers* Arch. Bd. **92**. S. 616, Anm. 1 (1902). — *Franz Müller*, Zur Kritik des *Miescher*schen Hämometers. Arch. f. Anat. u. Physiol. S. 443 (1901).

## Genauigkeit der Methode.

Die Methodik beruht darauf, daß die infundierten Mengen noch im Moment der zweiten Blutentnahme, gut durchgemischt, im Blut enthalten sind. Bei Kaninchen haben sich *Cohnstein* und *Zuntz* überzeugt, daß diese Voraussetzung zutrifft.[1] Injizierten sie $^1/_4$—$^1/_5$ der Blutmenge an 0·73%iger Kochsalzlösung dem freisitzenden Tier in eine Halsvene, so ergab die Blutkörperchenzählung 1—1$^1/_2$ Minuten später, in einem Fall (Versuch XVII) sogar noch 23 Minuten nach Beendigung der Infusion, die nach der Berechnung zu erwartenden Werte. Erst eine Stunde nach der Injektion war das Blut wieder erheblich konzentrierter.

Um diese notwendige Voraussetzung der Methode aber zu erfüllen, muß man genau isotonische Salzlösung verwenden und dafür sorgen, daß nicht bestimmte Gefäßgebiete infolge Reizung von Vasomotoren verengt, d. h. von der Zirkulation ausgeschlossen sind. Hundeblut hat eine sehr konstante Gefrierpunktserniedrigung, die 0·9% Kochsalz entspricht. Für den Menschen hält es *Kottmann*[2]) dagegen für nötig, in jedem Falle vor dem Versuch die Gefrierpunktserniedrigung nach den Methoden von *Hamburger* oder *Dreser* zu ermitteln. Werden nicht isotonische Lösungen von Körpertemperatur verwendet, so geht je nach der Salzkonzentration der infundierten Lösung die injizierte Wassermenge sehr schnell in die Gewebe über, oder es wird Flüssigkeit aus den Geweben aufgenommen.

Man muß aber auch bei isotonischen Lösungen sehr schnell infundieren. Sonst findet man ganz falsche Werte. So hatte ich[3]) 1901 bei Hunden von 5$^1/_2$ bzw. 6 *kg* nach Infusion von 100 *cm*³ 0·9%iger NaCl-Lösung während 5$^1/_2$ Minuten und Entnahme der zweiten Probe sofort nach Beendigung der Infusion durch Hämoglobinbestimmung die Blutmenge zu 281 *cm*³ gefunden, während die Durchspülung nach *Welcker* 390 *cm*³ lieferte und im zweiten Fall, in dem die Infusion 4 Minuten dauerte, durch Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung bei Probeentnahme 1 Minute nach beendeter Infusion: 410 *cm*³, nach *Welcker* 637 *cm*³.

Auch in Versuchen, die *A. Loewy* und ich kürzlich angestellt haben und bei denen wir dem von *Plesch* und *Zuntz*[4]) kürzlich empfohlenen Verfahren folgten und nach der sehr schnellen Infusion in Abständen von 30 Sekunden mehrere Proben entnahmen, sahen wir, daß man bei Hunden

---

und *H. Aron* und *Franz Müller*, Über die Lichtabsorption des Blutfarbstoffs. 1906. Suppl. 128.

[1]) *I. Cohnstein* und *N. Zuntz*, Untersuchungen über den Flüssigkeitsaustausch zwischen Blut und Gewebe. *Pflügers* Archiv. Bd. **42**. S. 319—321 (1888).

[2]) *K. Kottmann*, Über die Bestimmung der Blutmenge beim Menschen und Tier unter Anwendung eines neuen Präzisionshämatokriten. Arch. f. exper. Path. Bd. **54**. S. 356 (1906).

[3]) *Plesch* und *N. Zuntz*, Die Bestimmung der Blutmenge. Biochem. Zeitschr. S. 11 (1908).

[4]) l. c. 1901. S. 464.

außerordentlich schnell infundieren und die zweite Blutprobe der Infusion sofort folgen lassen muß. Wir fanden, wenn wir die Tiere entweder gar nicht narkotisierten oder sie, wenn sie wegen zu großer Unruhe narkotisiert und nach Einführung der Kanüle in die Carotis und die Vena jugularis wieder aus der Äthernarkose erwacht waren, daß bisweilen schon drei Minuten nach Beendigung des Einlaufs von auf Körpertemperatur erwärmter isotonischer 0·9%iger Kochsalzlösung der Austritt in die Gewebe beginnt. Die Schnelligkeit des Flüssigkeitsaustausches hängt ja außerdem von dem Verhältnis von injizierter Menge und Blutmenge ab. Um recht genaue Zahlen zu erzielen, muß man aber etwa 10% der Blutmenge infundieren. Wird der Gehalt der vor der Infusion entnommenen Blutprobe = 100 gesetzt (Hämoglobin oder Blutkörperzahl) und ist der darauf bezogene Prozentgehalt der nach der Infusion entnommenen Probe = h, hatte man c Kubikzentimeter infundiert, so ist die Blutmenge = $\frac{c \times h}{100 - h}$.

Es wird also die Genauigkeit, wie sich leicht berechnen läßt, um so größer, je mehr h von 100 abweicht, mit anderen Worten, je verdünnter das Blut geworden ist.

Beispiel: Es sei der Hb-Gehalt der Probe nach Infusion von 1000 $cm^3$ von 100% gesunken auf a = 90%, von 2000 $cm^3$ auf b = 80%.

Die Differenz der Bestimmungen des Hämoglobingehalts, der Fehler der Hb-Bestimmungsmethode betrage 2%. Also

$a_1$ 91 oder $a_2$ 89% $b_1$ 81 oder $b_2$ 79%.

Daraus berechnen sich:

$$a_1 \frac{1000 \times 91}{100 - 91} = 10·111\,cm^3 \qquad b_1 \frac{2000 \times 81}{100 - 81} = 8·526\,cm^3$$

$$a_2 \frac{1000 \times 89}{100 - 89} = 8·091\,cm^3 \qquad b_2 \frac{2000 \times 79}{100 - 79} = 7·524\,cm^3$$

$$a_1 - a_2 \text{ Differenz} = 2·020\,cm^3 \qquad b_1 - b_2 \text{ Differenz} = 1·002\,cm^3$$

$a_1$—$a_2$ Differenz in Prozent des Mittelwertes = 22·2%

$b_1$—$b_2$ " " " " " = 12·5%

Die folgenden Zahlen (S. 754) zeigen dementsprechend die bei derartigen Versuchen (Hunde) bisweilen notwendig eintretenden Ungenauigkeiten, sobald man geringere Mengen infundiert:

Zur Erklärung von Tabelle A sei bemerkt, daß 0·9%ige Kochsalzlösung immer genau 38° warm in die Jugularis einlief. Die Zeiten in Stab 4, 8, 12 verstehen sich nach dem Moment der Abklemmung der Jugulariseinlaufskanüle.

Stab 5, 9, 13 zeigen die Ablesungswerte (Mittel von 10 Ablesungen) in Chromophotometer oder *Miescher-Fleischls* Hämometer. Stab 6, 10, 14

Tabelle *A*.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. des Hundes | Körpergewicht *kg* | Infundierte Menge in % des Körpergewichts | Erste Blutentnahme nach Ende der Infusion | | | | Zweite Blutentnahme nach Ende der Infusion | | | | Dritte Blutentnahme nach Ende der Infusion | | | | Laufende Nr. |
| | | | Minuten | Hämoglobinablesung | Hämoglobingehalt %[2] | Blutmenge *cm*³ | Minuten | Hämoglobinablesung | Hämoglobingehalt %[2] | Blutmenge *cm*³ | Minuten | Hämoglobinablesung | Hämoglobingehalt %[2] | Blutmenge *cm*³ | |
| 4 | 7·700 | 0·96 | 2′ 10″ | 65·3 | 92·8 | 967 | 3′ 10″ | 65·7 | 94·8 | 1367 | 4′ 10″ bis 6′ 10″ | 65·9 | 95·8 | 1736 | 1 |
| 4 | 10·62 | 1·9 | ½ | 61·8 | 84·4 | 1093 | 1 | 63·8 | 87·2 | 1355 | 1½ | 62·9 | 85·9 | 1213 | 2 |
| 4 | 12·0 | 1·7 | ½ | 83·7 | 87·4 | 1390 | 1 | 83·9 | 87·6 | 1413 | 1½ | 84·0 | 87·7 | 1426 | 3 |
| 5 | 8·04 | 1·2 | 2′ | 65·5 | 95·7 | 2139(!) | 3 | 66·0 | 98·3 | 5407(!!) | 4—7 | 66·3 [1] | 99·8 | — | 4 |
| 5 | 11·35 | 1·7 | ½ | 82·8 | 91·7 | 2196(!) | 1 | 82·8 | 91·7 | 2196 | 1½ | 84·7 | 93·8 | 3010 | 5 |
| 5 | 13·56 | 1·5 | ½ | 73·5 | 82·9 | 945 | 1 | 77·5 | 87·4 | 1387 | 1½ | 76·0 | 85·7 | 1198 | 6 |
| 1 | 6·65 | 1·4 | 3 | 64·4 | 90·1 | 870 | 3½ | 64·5 | 90·6 | 922 | 4½ bis 6 | 64·5 | 90·6 | 922 | 7 |
| 1 | 9·17 | 2·2 | ½ | 86·7 | 87·9 | 1450 | 1 | 87·0 | 88·2 | 1488 | 1½ | 87·5 | 88·7 | 1563 | 8 |
| 6 | 6·12 | 2·4 | ½ | 62·9 | 82·4 | 700 | 1 | 63·2 | 84·0 | 782 | 1½ | 63·6 | 86·0 | 915 | 9 |
| 6 | 10·52 | 1·9 | ½ | 74·3 | 89·7 | 1739 | 1 | 74·5 | 90·0 | 1790 | 1½ | 75·6 | 91·3 | 2088 | 10 |
| 9 | 6·53 | 2·7 | ½ | 63·1 | 83·3 | 860 | 1 | 63·5 | 85·4 | 1006 | 1½ bis 4 | 63·7 | 86·4 | 1089 | 11 |
| 9 | 10·14 | 1·9 | ½ | 71·5 | 76·4 | 644 | 1 | 83·3 | 89·0 | 1610 | 1½ | 78·5 | 83·9 | 1037 | 12 |
| 9 | 14·3 | 1·4 | ½ | 65·3 | 81·4 | 875 | 1 | 62·2 | 77·5 | 689 | 1½ | 70·5 | 87·9 | 1452 | 13 |
| 3 | 7·14 | 2·1 | ½ | 63·2 | 83·8 | 776 | 1 | 63·4 | 84·8 | 831 | 1½—2 | 63·85 | 87·1 | 1006 | 14 |
| 3 | 10·45 | 1·9 | ½ | 64·7 | 83·5 | 1007 | 1 | 64·6 | 83·4 | 999 | 1½ | 64·5 | 83·2 | 986 | 15 |
| 7 | 7·7 | 2·0 | ½ | 64·3 | 92·7 | 1896 | 1 | 64·6 | 94·2 | 2437 | 2 | 65·0 | 87·9 | 3562 | 16 |
| 7 | 12·07 | 1·7 | ½ | 70·9 | 78·3 | 726 | 1 | 73·0 | 80·6 | 827 | - | — | — | — | 17 |

[1]) Verdünnung ausgeglichen, Wert wie vor Infusion.

[2]) Hämoglobingehalt der Blutprobe vor Infusion = 100 gerechnet.

bedeuten den prozentischen Blutfarbstoffgehalt des Blutes, bezogen auf die Blutprobe vor der Infusion = 100.

Zunächst scheiden einige ganz unmögliche Zahlen aus, ein Teil ist mit ! versehen (lfd. Nr. 4, 5). Hier war die eingetretene Blutverdünnung zweifellos nicht der injizierten Menge Salzlösung entsprechend, sei es, daß ein Teil von ihr in dem Stamm der V. jugularis stagnierte, sei es, daß die erste Probe zu spät nach beendeter Infusion entnommen wurde (2') und schon erhebliche Mengen die Blutgefäße verlassen hatten.

Die Tabelle zeigt weiter für die einwandfreien Proben beim Vergleich von Stab 7, 11, 15, daß, wenn wir 1/2 Minute nach Beendigung des Einlaufs, der selbst nicht mehr als höchstens 1 1/2 Minuten andauern darf, die erste Probeentnahme machten und in 30 Sekunden Intervallen fortfuhren, die Blutkonzentration teils während 1/2—1 1/2 Minuten nach beendeter Infusion gleich blieb (lfd. Nr. 3 der Tabelle). Teils war es aber nach 1 Minute schon zu spät und ein Teil Flüssigkeit aus der Blutbahn verschwunden, teils blieb sie sogar noch nach 3—6' (lfd. Nr. 7 der Tabelle) in der Zirkulation. Es ist daher schwer zu beurteilen, ob der niedrigste Wert auch in der Tat der erzeugten Verdünnung entspricht oder ob nicht doch schon vorher etwas von der Salzlösung aus der Blutbahn verschwunden ist, wenn man nicht gerade Glück hat und mehrere Proben die gleiche Zusammensetzung haben.

Die Genauigkeit aller indirekten Methoden der Blutmengenbestimmung hängt weiter von der Genauigkeit der benutzten Bestimmung, sei es des Farbstoffs, sei es der Trockensubstanz oder Blutkörperzahl, ab.

Nach *Lion* und *Thoma* ist aber der Fehler bei der Zählung roter Blutkörperchen im günstigsten Falle bei

| | | |
|---|---|---|
| 200 | Zellen | 5% |
| 250 | „ | 2% |
| 5.000 | „ | 1% |
| 20.000 | „ | 0·5% |

Man muß im allgemeinen mit einem Fehler von mindestens 0·6 bis 2% der Blutkörperzahl rechnen.

Bei der Blutfarbstoffbestimmung ist der Fehler im *Miescher-Fleischl*schen Apparat nach *Veillon* 1—1 1/2%, im *Sahli*schen Hämometer 2—3%. Der Ablesungsfehler im Spektrophotometer beträgt 0·7% der Ablesungszahl, wenn man die besten *Hüfner*schen Ablesungen allein berücksichtigt. Andere Untersucher haben nur die Hälfte der Genauigkeit, d. h. 1·5% Abweichung, erreicht. Mit dem Chromophotometer hat *Plesch*[1]) 0·5% bei normalem Blut erreicht. Er glaubt, daß selbst schlechte Ableser keine höheren Abweichungen als 1% zu verzeichnen haben werden.

---

[1]) *J. Plesch*, Das Chromophotometer. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 63. Heft 5, 6 (1907).

Um die Genauigkeit zu erhöhen, hat *Kottmann* zur Bestimmung des Blutkörperchenvolumens den Hämatokrit so verändert, daß er eine genauere Ablesung des Blutkörperchenvolumens gestatten soll, als bei den bisher verwendeten Instrumenten möglich war: Die Zentrifugenröhrchen werden in Abstände von 0·5 *mm* geteilt, was 0·2% des Gesamtinhaltes des Röhrchens anzeigt. Die Ablesung wird dadurch fünfmal genauer als bisher und es sollen Blutkörperchenvolumina direkt bis auf 0·2%, schätzungsweise bis auf 0·1%, mit der Lupe bis auf 0·05% genau abgelesen werden können. Das Blut wird dabei durch Zusatz von einer geringen Menge Hirudin ungerinnbar erhalten.

In der folgenden Tabelle *B* sind sieben Bestimmungen der Tabelle *A* einer Fehlerberechnung zugrunde gelegt. Sie wurde in der Art ausgeführt, daß angenommen wurde, die Mittelwerte der Hämoglobinbestimmungen (je 10 Ablesungen) zweier nach der Infusion im Abstand von 30″ entnommener Proben differierten um 0·1—2·0° der Ablesungsskala des Instrumentes (siehe Stab 3). Solche Differenzen wurden in der Tat gefunden. Daraus folgt eine Differenz der relativen Hämoglobinwerte in den 2 Proben von 0·12—3% Blutfarbstoff (Stab 4). Die aus beiden Proben berechnete Gesamtblutmenge differiert um 13—814 $cm^3$ (Stab 5) oder in Prozenten des Mittelwertes um 0·9—31% (Stab 6).

Tabelle *B*.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|
| Laufende Nr. der Tabelle *A* | Infundierte Menge in % des Körpergewichts | Differenz der Mittelwerte von 10 Ablesungen bei Proben mit 30″ Intervall nach der Infusion | | Differenz der Blutmenge in | |
| | | in Graden der Teilung des Hämoglobinometers | in der Hb-Prozentzahl | $cm^3$ | % des Mittelwertes |
| 2 | 1·9 | 2·0 | 3 | + 262 | 21 |
| 2 | 1·9 | 0·9 | 1·4 | — 142 | 11 |
| 3 | 1·7 | 0·2 | 0·24 | + 23 | 1·6 |
| 3 | 1·7 | 0·1 | 0·12 | + 13 | 0·9 |
| 5 | 1·7 | 1·9 | 2·3 | + 814 | 31 |
| 14 | 2·1 | 0·2 | 0·3 | + 55 | 6·8 |
| 14 | 2·1 | 0·4 | 0·6 | + 175 | 19 |

Daraus folgt, daß die Blutkörperchenzählung überhaupt nur bei Zählung sehr großer Mengen von Zellen, das *Sahli*sche Hämometer gar nicht, die anderen Hämoglobinometer nur bei großer Übung gebraucht werden dürfen. Fehler von 0·5% des Hb-Prozentgehalts (Tabelle *B*, Stab 4) lassen sich trotzdem nicht immer vermeiden und bedingen beim Tier einen Fehler in der Blutmenge von 10—20% des Wertes trotz Infusion von etwa 2% des Körpergewichtes.

Auch zu Versuchen am Menschen hat *Plesch* die Infusionsmethode mit Einhaltung etwa der gleichen Zeiten für die Blutentnahmen empfohlen.[1] Die Werte können hier aber auch im günstigsten Falle nicht sehr genau werden, da die infundierte Menge pro Kilogramm Körpergewicht und dementsprechend die relative Verdünnung des Blutes geringer sein muß (2% des Körpergewichts wäre etwa $1^1/_2$ Liter!). Störend ist auch, daß nach Infusion von genau isotonischer, steriler Salzlösung meist Schüttelfrost und Fieber auftritt. So sahen *Cohnstein* und *Zuntz* bei Kaninchen eine halbe Stunde nach der Injektion einen Anstieg der Temperatur von 39·0 auf über 40°, nach 3 Stunden über 41, nach etwa 9 Stunden war die Temperatur wieder normal. Auch *Plesch* sah dieses aseptische Fieber, das etwa 3 Stunden anhält, fast regelmäßig beim Menschen.

Beispiel: Infundierte Menge $^1/_2$% des Körpergewichts von 70 *kg* = 350 $cm^3$. Hb-Prozentgehalt mit Chromophotometer bei Verdünnung $^1/_{250}$ bestimmt Zunahme der Schichtdicke nach Infusion von 20·0 *mm* auf 21·9 *mm*. Methodische Fehler des Chromophotometers 0·1 *mm (Plesch)*, d. h. Schichtdicke *a)* 21·8 *mm* oder *b)* 22·0 *mm*. Die Berechnung ergibt:

$$a)\ \text{Hb-Abnahme} = 91{\cdot}74\%;\ \text{Blutmenge} = \frac{350 \times 91{\cdot}74}{8{\cdot}26} = 3887\ cm^3$$

$$b)\ \text{Hb-Abnahme} = 90{\cdot}91\%;\ \text{Blutmenge} = \frac{350 \times 90{\cdot}91}{9{\cdot}09} = 3500\ cm^3$$

Differenz = 387 $cm^3$ oder 10·5% des Mittelwertes.

Apparate zur Infusion:

1. Tier: Zur Infusion bedienten sich *Loewy* und Verf. einer 100 $cm^3$ fassenden, genau geteilten Bürette mit Schlauchklemme. Sie mündet unten in eine **T**-Leitung, deren einer Schenkel zu dem die gewärmte Kochsalzlösung enthaltenden Gefäß führt, deren anderer mit der gleichfalls durch eine Klemme abgeschlossenen Venenkanüle (Jugularis) verbunden ist. Die Bürette ist oben durch einen einfach durchbohrten Stopfen verschlossen. In seiner Bohrung sitzt ein **Y**-Rohr, dessen einer Schenkel mit einem Gummidoppelgebläse in Verbindung steht, während der andere Schenkel vermittelst eines langen Schlauches das Aufsaugen von Flüssigkeit in die Bürette gestattet. Will man möglichst schnell infundieren, wie das nach dem Gesagten sehr wünschenswert ist, so saugt man, nachdem die Verbindung zur Vene luftfrei mit Kochsalzlösung gefüllt ist, zunächst die etwa 40° warme isotonische Kochsalzlösung bis zur Nullmarke in die Bürette ein, schließt die benutzte Leitung, erzeugt mit dem Doppelgebläse Druck und drückt in einer Minute etwa 100 $cm^3$ durch die Vene in das Tier hinein.

2. Mensch: *a) Kottmann* empfiehlt einen graduierten Erlenmeyerkolben von 1 *l* Inhalt mit langem Hals, an dem sich eine genaue Einteilung zur

---

[1] *J. Plesch,* Hämodynamische Studien. Zeitschr. f. exper. Pathol. Bd. **6**. S. 395 ff. (1909).

Messung der letzten 150 *cm*³ befindet. Er ist durch einen dreifach durchbohrten Stopfen verschlossen. Durch die eine Bohrung führt eine Verbindung zu dem mit der Infusionskanüle verbundenen Schlauch. Die Flüssigkeit passiert vor Eintritt in die Punktionsnadel ein Glasröhrchen, in dem sich ein Thermometer befindet. Die zweite Bohrung enthält das Glasrohr zum Einfüllen der Lösung, die dritte das oben kurz mündende Rohr zur Verbindung mit einem Doppelgebläse. Die Flasche sowie die Lösung sind vor dem Gebrauch durch Kochen sterilisiert. Während der Infusion befinden sie sich in einem auf 42° gehaltenen Wasserbade.

Zusammenfassung. Die bisher mit der Infusionsmethodik gemachten Erfahrungen sprechen dafür, daß besondere Übung und besonders günstige Umstände dazu gehören, um exakte Werte zu erzielen. Die bisher angestellten Vergleiche mit nach *Welcker*scher, richtig ausgeführter Methodik erhaltenen Blutmengenwerten sind noch zu wenig zahlreich, um die Exaktheit der Infusionsmethode zu garantieren. Wir selbst haben, nachdem wir uns eingeübt hatten, wie oben bewiesen, doch noch bisweilen so stark abweichende Zahlen erhalten, daß bei Hunden wenigstens die Vasomotorentätigkeit das Gelingen des Versuchs ohne Verschulden des Experimentators leicht in Frage stellen kann. Kann man sehr große Flüssigkeitsmengen sehr schnell infundieren (4—5% des Körpergewichts), so sind die Aussichten besser.

*b)* Aderlaßmethode: Die von *Vierordt* zuerst ersonnene Methode, einen Aderlaß von bestimmter Größe zu machen und, sobald anzunehmen ist, daß das Blut durch Aufnahme von Lymphe das alte Volumen wieder erreicht hat, aber noch keine neuen Blutkörperchen sich gebildet haben, einen zweiten Aderlaß zu machen und aus dem Vergleich beider die gesamte Blutmenge zu bestimmen, eine Methode, die einmal mit Erfolg von *Mallassez* beim Menschen benutzt wurde, hat sich nicht eingebürgert. Es ist fraglich, ob die Voraussetzung zutrifft, daß im Moment der größten Verdünnung, wenn die Zahl der Blutkörperchen maximal abgenommen hat, das Volumen des Gefäßsystems das gleiche ist wie vor der Blutentnahme. Es ließen sich zahlreiche Bedenken gegen diese Voraussetzung anführen. In der Klinik wird man nur in besonderen Ausnahmefällen, wenn ohnedies ein größerer Aderlaß notwendig wird, eventuell einen Versuch mit dieser Methode machen.

Anknüpfend an *Malassez* hat *Nelson*[1]) ganz kürzlich die Methode in theoretisch richtigerer Art abgeändert. Beim Kaninchen wurde die Blutkörperzahl im Ohrvenenblut gezählt (a), in die Carotis eine Kanüle mit **T**-Gabelung eingeführt, 18—40 *cm*³ Blut durch den linken Schenkel abgelassen und sofort durch den anderen Schenkel die gleiche Menge Kaninchenserum körperwarm schnell infundiert (c). Das Serum war 12 Stunden zuvor gewonnen, zentrifugiert, klar, auf Eis aufbewahrt.

[1]) *L. Nelson,* Über eine Methode der Bestimmung der Gesamtblutmenge. Arch. exp. Pathol. Bd. **60.** S. 340 (1908).

30 Minuten nach beendeter Infusion erfolgte die zweite Probezunahme von Ohrvenenblut, in dem ebenfalls die Blutkörperzahl bestimmt wurde (b).

Die Blutmenge $v = \frac{a \cdot c}{a - b}$.

So ist diese Methode also eine Infusionsmethode geworden und ihre Genauigkeit hängt von der Güte der Blutkörperzahlbestimmungen (siehe S. 717) und dem Fehlen vasomotorischer Unregelmäßigkeiten bei den Probeentnahmen ab (siehe S. 707).

*c)* **Kohlenoxydmethode.** Von der größten Bedeutung ist die zuerst von *Gréhant* und *Quinquaud* angewandte Versuchsanordnung, die auf der Beimischung einer leicht nachweisbaren Substanz zum strömenden Blut, die sich während des Verweilens im Körper nicht verändert, beruht. Bisher ist hierfür nur das Kohlenoxyd benutzt worden. Zunächst ist die Voraussetzung, daß Kohlenoxyd auch in kleinen Mengen im Körper nicht verbrannt wird, eine Annahme, die von *Wachholtz*[1]) bestritten wurde, mehrfach und zuletzt durch *Haldane*[2]) zweifellos bewiesen worden.

*Haldane* und *Lorrain Smith*[3]) haben die Methodik *Gréhants* außerordentlich vereinfacht. Sie ist neuerdings von *Zuntz* und *Plesch*[4]) in etwas anderer Form sehr empfohlen worden. Das Prinzip ist folgendes: Man läßt ein bekanntes Volumen (v bei 0° und 760 *mm*) reinen Kohlenoxyds atmen und bestimmt die Menge des CO in 100 $cm^3$ Blut (p).

Die Blutmenge M ist dann: $\frac{M}{100} = \frac{v}{p}$

Versuchsanordnung: 1. *Haldane* und *Lorrain Smith* gingen so vor, daß sie den Menschen aus einem Gummisack von etwa 2 *l* Inhalt durch ein Mundstück Luft, die durch ein zwischengeschaltetes Natronkalkgefäß kohlensäurefrei gemacht wurde, atmen ließen. Der verbrauchte Sauerstoff wurde dem Sack aus einem Zylinder nach Bedarf ergänzend zugeführt. Sobald die Person ruhig atmete und die Sauerstoffzufuhr reguliert war, wurde durch einen Dreiweghahn die Verbindung mit einem schmalen, graduierten Meßzylinder, in dem sich Kohlenoxyd befand, hergestellt und alle 2 Minuten ungefähr 30 $cm^3$ in den Sack eingeführt. Nachdem die gewünschte Menge (zwischen 116 und 160 $cm^3$ bei 0° und 760 *mm* gemessen) verbraucht war und der in den Verbindungsröhren steckende Rest durch Sauerstoff ausgewaschen und eingeatmet war, wurde 1 Tropfen Blut für die Analyse entnommen. Zur Sicherheit wurde noch 2 oder 3 Minuten später eine

[1]) *Wachholtz, Pflügers* Arch. Bd. **74**. S. 174 (1899) und Bd. **75**. S. 341 (1899).

[2]) *Haldane,* Journ. of Physiol. Vol. **20**. p. 514 (1896) und The supposed oxydation of carbonic oxide in the living body. Journ. of Physiol. Vol. **25**. p. 225 (1900).

[3]) *J. Haldane* and *J. Lorrain Smith,* The mass and oxygen capacität of the blood in man. Journ. of Physiol. Vol. **25**. p. 331 (1899).

[4]) *N. Zuntz* und *J. Plesch,* Methode zur Bestimmung der zirkulierenden Blutmenge beim lebenden Tier. Biochem. Zeitschr. Bd. **11**. S. 47 (1908) und *J. Plesch,* Hämodynamische Studien. Zeitschr. f. exper. Pathol. Bd. **6**. S. 405 (1909).

zweite Blutentnahme gemacht. Es stellte sich immer heraus, daß beide Proben genau miteinander übereinstimmen. Das beweist, daß das Kohlenoxyd sich schnell und gleichmäßig im Körper verteilt hat.

Die prozentische Sättigung des Blutfarbstoffs mit CO wurde kolorimetrisch nach der von *Haldane*[1]) ausgearbeiteten Carminmethode bestimmt. Um sicher zu sein, daß das ganze zugeführte CO auch von Blut aufgenommen war, wurde eine Probe der Restluft aus dem Sack entnommen und in dem auf S. 642 dieses Handbuches angegebenen Apparat analysiert. Es waren immer weniger als 0·05% CO in der Luft enthalten. Endlich wurde eine Analyse des eingeatmeten CO gemacht, weil immer etwas Luft in ihm enthalten ist. Angenommen, es waren 150 *cm*³ eingeatmet, das Blut zu 25% gesättigt, so ist die Sauerstoffkapazität des ganzen zirkulierenden Blutes x : 150 wie 100 : 25 = 600 *cm*³. War weiterhin die vor Beginn der Einatmung ermittelte Sauerstoffkapazität 20, so berechnet sich jetzt die zirkulierende Blutmenge $y = \frac{100}{20 \times x} = 3000\, cm^3$.

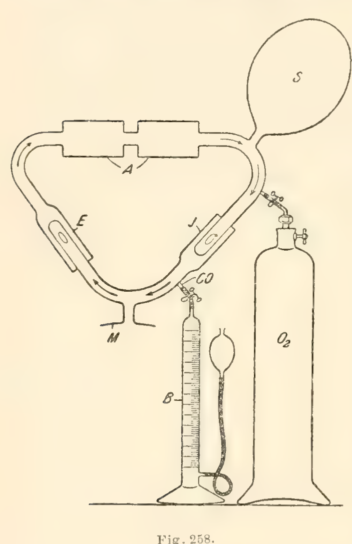


Fig. 258.

*Douglas*[2]) hat so bei 9 Kaninchen die Blutmenge bestimmt. Wenige Tage auseinanderliegende Doppelbestimmungen ergaben Differenzen von etwa 1—2% des Wertes. Ein Vergleich mit der *Welcker*schen Methodik ergab Fehler zwischen + 15 und — 12%, im Mittel — 3%, also ein recht befriedigendes Resultat.

2. *Zuntz* und *Plesch* lassen das Versuchsobjekt entweder durch eine Trachealkanüle oder ein Mundstück bei geschlossener Nase aus einem geschlossenen Luftkreislauf atmen. In ihm (siehe Fig. 258) befinden sich ein In- und ein Exspirationsventil (*J* und *E*), eine Kohlensäureabsorptionsvorrichtung *A*, wie sie bei Rettungsapparaten von dem Drägerwerk in Lübeck geliefert wird, der Gummiballon *s*, eine **T**-Leitung zu einem Sauerstoffzylinder $O_2$ und an der Einatmungsseite, ganz nahe dem Mundstück *M*, die **T**-Leitung zu einer *Hempel*schen Bürette, in welcher sich reines CO befindet.

Nachdem nach vorheriger möglichst vollkommener Exspiration mehrere Atemzüge aus dem Sack getan sind, führt man pro Kilo etwa 2½—3 *cm*³

[1]) *J. Haldane*, Colorimetic determination of haemoglobin. Journ. of Physiol. Vol. **22**. p. 232 (1897).

[2]) *C. G. Douglas*, A method for the determination of the volume of blood in animals. Journ. of Physiol. XXXIII. Vol. **6**. p. 493 (1906).

CO während etwa 3 Minuten zu. Es wird noch 3—4 Minuten lang weiter aus dem Sack geatmet, und zwar darf der Sack infolge Sauerstoffverbrauchs nicht vollkommen zusammenfallen, sonst muß man etwas Sauerstoff aus der Bombe zugeben. Die Versuchsanordnung hat vor der *Haldanes* zweifellos den Vorzug, daß das Kohlenoxyd aus der Bürette direkt in die Lunge gelangt und nicht erst wie bei *Haldane* in dem Sack verdünnt wird. Während der Atmung aus dem Sack werden aus einer Vene mittelst Spritze, in der sich etwas trockenes Hirudin oder fein gepulvertes oxalsaures Ammon befindet, etwa 5 $cm^3$ Blut entnommen. Das Blut wird aus der Spritze, ohne mit der Luft sonst in Berührung zu kommen, in enge Pipetten von 1 $cm^3$ eingesogen, in die auf S. 695 erwähnten Entwicklungsgefäßchen übergeführt und die Kohlenoxydbestimmung weiter, wie dort beschrieben, vorgenommen. Das CO, und zwar sowohl das aus dem Blut in Freiheit gesetzte wie das eingeatmete Gas, wird in dem auf S. 642 beschriebenen Verbrennungsapparat analysiert.

Beispiel: Einem Manne von 65 *kg* wurden in $6^1/_2$ Minuten 183·2 $cm^3$ CO bei 17·7° und 756 *mm* Barometerstand zugeführt, d. i. 167·2 $cm^3$ CO bei 0° und 760 *mm* (vgl. Tab. *B*, S. 590). Nachdem noch 9 Minuten lang aus dem Sack geatmet war, wurde die Blutprobe entnommen. Drei Analysen derselben lieferten im Mittel 4·737% CO im Blut. In der Atemluft hatte sich gefunden (Restluft) 0·027% CO. Nimmt man das Volumen der Atemwege zu 4 *l*, so sind darin 1·08 $cm^3$ CO. In den Körpersäften sind unabsorbiert geblieben zirka 0·3 $cm^3$. Es sind also 167·2—1·38 = 165·8 $cm^3$ CO vom Blutfarbstoff gebunden worden. Die Blutmenge beträgt x : 100 wie 165·8 : 4·737 = 3500 $cm^3$ = 3693 *g* oder 1 : 17·6 des Körpergewichts.

## 3. Bestimmung der pro Zeiteinheit umlaufenden Blutmenge.

### a) Messung des Auswurfsvolumens des Herzens.

Es muß bei der Methode von *Zuntz* und *Plesch* immer reines Kohlenoxyd geatmet werden. Leuchtgas gibt ganz falsche Werte, da es noch andere absorbierbare, brennbare Gase enthält. Der im Körper bleibende, nicht absorbierte Kohlenoxydrest ist sehr gering, ebenso die von den anderen Körperflüssigkeiten absorbierten Mengen. In Summa wird dieser Fehler etwa 3 $cm^3$ betragen. Erhebliche Fehler bemerkten die Autoren nur, wenn das Individuum in den letzten Stunden vor dem Versuch sich in stark durch Leuchtgas verunreinigter Luft aufgehalten oder stark geraucht hatte. Dann wachsen die im Blut stets vorhandenen Spuren von CO sehr erheblich an.

Eine zweite, leider noch zu wenig erprobte Methode ist von *Zuntz*[1]) angegeben, von *A. Loewy*[2]) bei fünf[3]) und in letzter Zeit von *Mohr*[3]) bei sechs Hunden verwendet worden.

---

[1]) *N. Zuntz,* Eine neue Methode zur Messung der zirkulierenden Blutmenge und der Arbeit des Herzens. *Pflügers* Arch. Bd. 55. S. 521 (1894).

[2]) *A. Loewy,* Untersuchungen über Respiration und Zirkulation. Berlin 1895. Verlag A. Hirschwald. S. 108.

[3]) *L. Mohr,* Über regulierende und kompensierende Vorgänge im Stoffwechsel des Anämischen. Zeitschr. f. exp. Pathol. Bd. 2. S. 458 (1906).

Sie beruht auf folgendem Gedankengang und ist gleichzeitig eine Methode zur Bestimmung des Auswurfsvolumens des Herzens: Der Druck in der Aorta wird bestimmt durch die Summe der mit der wechselnden Innervierung der Gefäßmuskeln variierenden Widerstände und durch die Blutmenge, welche das Herz in der Zeiteinheit in der Aorta einpreßt. Wenn die Tätigkeit des Herzens plötzlich aufhört, kann man den Blutdruck dadurch auf seiner normalen Höhe erhalten, daß man auf irgend einem Wege der Aorta ebensoviel Blut zuführt, wie sie vorher vom Herzen erhielt. Man wird also die vom Herzen gelieferte Blutmenge durch diejenige messen können, welche man nach seiner Stillstellung in die Aorta injizieren muß, damit die manometrisch gemessene Spannung auf ihrer vorigen Höhe bleibt.

Versuchsanordnung: Der Blutdruck wird durch ein mit der Schenkelarterie des Versuchstieres unterhalb des Abganges der Arteria profunda femoris verbundenes Quecksilbermanometer angezeigt. In den freien Schenkel dieses Manometers ist ein Platindraht eingeführt, welcher mit einem Elektromagneten in Verbindung steht und in jeder beliebigen Tiefe fixiert werden kann. Unmittelbar vor Ausführung des messenden Versuchs stellt man ihn so, daß er bei dem gerade herrschenden mittleren Blutdruck mit der Kuppe des Quecksilbers in Kontakt tritt. Infolgedessen findet, so lange die normale Herzarbeit fortdauert, beim Steigen des Pulses Kontakt und Stromschluß, beim Sinken Stromunterbrechung statt. Der Platindraht und die Quecksilbersäule gehören einem von drei kräftigen Bunsenelementen gespeisten Stromkreis mit starkem Elektromagnet an. Der Anker desselben ist mit einem Hebel verbunden, welcher einen Gummischlauch zudrückt, sobald er angezogen wird und dessen Lumen freigibt, wenn er von dem Magneten losgelassen wird. Der Schlauch führt zu einer mit Blut oder Kochsalzlösung gefüllten, auf Körpertemperatur erwärmten Bürette und auf kürzestem Wege mittelst einer möglichst weiten Kanüle in das zentrale Ende der Carotis des Versuchstieres. Die Bürette ist oben geschlossen und mit einem komprimierten Sauerstoff unter einem Überdruck von 300 *mm* Quecksilber enthaltenden Gefäß verbunden. Es wird daher, wenn die Leitung zwischen Bürette und Arterie geöffnet ist, Blut mit großer Kraft in die Aorta des Tieres eingepreßt. Man erzeugt nun in bekannter Weise durch Vagusreizung am Halse vorübergehenden Stillstand des Herzens. Der Blutdruck sinkt. In dem Moment des Sinkens beginnt man mit dem Einströmenlassen des Blutes oder der Kochsalzlösung. Sobald das steigende Quecksilber im Manometer den zuvor herrschenden Mitteldruck, auf den der Kontakt eingestellt ist, übersteigt, wird der Blutzufluß elektromagnetisch gesperrt, so lange bis der Druck wieder unter diesem Stand sinkt. Nach 5–15 Sekunden rhythmischen Einströmens wird der Versuch durch Unterbrechung der Reizung und Absperren der Bürette unterbrochen.

Beispiele (siehe *Mohr*, l. c.):

| Versuchs-Nr. | Gewicht des Hundes *kg* | Infundierte Menge | Dauer des Einstromens Sekunden | Zirkulierende Blutmenge pro *kg* und Minute $cm^3$ |
|---|---|---|---|---|
| 1 | — | 33 | 5 | 63·3 |
| | | 34 | 5 | |
| | | 35 | 4 | |
| | | 36 | 4 | |
| 2 | 9 | 45 | 5 | 63·5 |
| | | 62·5 | 7 | |
| | | 48·5 | 5 | |
| 3 | 4$^1/_2$ | 50 | 5 | 125·2 |
| | | 46 | 4$^1/_2$ | |
| | | 47 | 5$^3/_4$ | |
| 4 | 14$^1/_2$ | 70 | 7 | 40·9 |
| | | 58 | 6 | |
| | | 22 | 2 | |
| | | 36 | 4 | |
| 5 | 8$^1/_2$ | 37·5 | 5$^1/_2$ | 50·8 |
| | | 54 | 7 | |
| | | 51 | 7$^1/_4$ | |
| 6 | 13·2 | 43 | 3$^1/_2$ | 52·2 |
| | | 79 | 7$^1/_2$ | |
| | | 118 | 10$^3/_4$ | |
| | | 62 | 5 | |

Nach *Tigerstedt* kann auch die in der Aorta pro Minute und Kilogramm Tier zirkulierende Menge mit einer Stromuhr gemessen werden, auf die in diesem Zusammenhang ebenso wenig wie auf die Messung mit der *Hürthle*schen Stromuhr eingegangen werden kann.

### *b)* Bestimmung der pro Zeiteinheit zirkulierenden Blutmenge aus dem Sauerstoffverbrauch.

*Gréhant* und *Quinquaud* [1]) haben zuerst durch Kombination eines Respirationsversuches mit der Messung der Blutgase im arteriellen und venösen Blut am Hunde die zirkulierende Blutmenge bestimmt. Ihnen folgten *Zuntz* und *Hagemann* [2]) mit Versuchen am Pferde, *A. Loewy* und *v. Schrötter* am Menschen.

Nehmen wir an, 100 $cm^3$ Blut verlieren beim Passieren der Kapillaren a $cm^3$ Sauerstoff, der $O_2$-Verbrauch pro Minute sei A, so muß eine dem

[1]) *Gréhant* und *Quinquaud*, C. R. Soc. biol. 1886. Nr. 12. S. 159.

[2]) *N. Zuntz* und *O. Hagemann*, Der Stoffwechsel des Pferdes. Landwirtsch. Jhrb. Bd. 27. Suppl. III (1898). — *A. Loewy* und *H. v. Schrötter*, Untersuchungen über die Blutzirkulation beim Menschen. Zeitschr. f. exp. Pathol. Bd. 1. S. 197 (1905).

Verhältnis A:a entsprechende Blutmenge x die Kapillaren pro Minute passieren:

$$x = \frac{A \times 100}{a}.$$

Bei dieser Überlegung ist allerdings vorausgesetzt, daß sich nicht in der Lunge selbst Oxydationsprozesse in größerem Umfange vollziehen, was *Bohr* annimmt. Ebenso bestreitet *Bohr*, daß verschiedene Individuen der gleichen Tierart die gleichen Beziehungen zwischen Gasspannung und Gasgehalt des Blutes zeigen, daß man die Dissoziationskurve für verschiedene Individuen verwerten dürfe. Diese Schwierigkeit ist leicht durch Verwendung der neuen *Barcroft*schen Ferricyanid-Differentialmethoden zur Blutanalyse zu vermeiden: Bestimmt man in 1 $cm^3$-Proben die Differenz des Sauerstoffgehalts im Arterien- und Venenblut und in anderen Proben mit beliebigen Gasmischungen die Dissoziationskurve des betreffenden Individuums, so lassen sich bei Verwendung von etwa 10 $cm^3$ Blut eine große Zahl von Analysen unschwer anstellen.

---

# Stoffwechselendprodukte.

## A. Nachweis und Bestimmung der Eiweißabbauprodukte im Harn und in den Faeces.

Von **Peter Rona**, Berlin.

### Ammoniak.

Nachweis. Man läßt aus dem mit Kalkmilch versetzten Harn (ca. 25 $cm^3$) das Ammoniak im *Schlösing*schen Apparat in ca. 5 $cm^3$ mit Salzsäure angesäuertes Wasser absorbieren; nach 24 Stunden stellt man in diesem die üblichen Reaktionen (z. B. mit dem *Nessler*schen Reagens[1]) auf Ammoniak an. Oder man verschließt mit Kalkmilch versetzten Harn in einem Kolben oder im Reagenzglas mit einem Stopfen, an dem feuchtes Lackmuspapier oder feuchtes Curcumapapier befestigt ist. Blaufärbung bzw. Braunfärbung des Papiers zeigt das Ammoniak an. Wird ein mit verdünnter Salzsäure befeuchteter Glasstab über die Öffnung des Kolbens gehalten, so entwickeln sich am Glasstabe weiße Nebel von Chlorammonium.

#### Quantitative Bestimmung des (präformierten) Ammoniaks im Harn.

#### Methode von *Folin*.

Das Prinzip der Ammoniakbestimmung nach *Folin*[2]) beruht darauf, daß das freigesetzte Ammoniak bei Zimmertemperatur oder in der Kälte durch einen starken Luftstrom ausgetrieben wird.

[1]) Ammonsalze geben mit dem *Nessler*schen Reagens (alkalische Quecksilberjodid-jodkaliumlösung) rötlichgelben bis rötlichbraunen Niederschlag von Merkuriammoniumjodid. Das *Nessler*sche Reagens wird so dargestellt, daß man 50 *g* Jodkalium in 50 $cm^3$ heißem destilliertem Wasser löst und die Lösung mit einer heißen konzentrierten Quecksilberchloridlösung versetzt, bis der entstehende rote Niederschlag sich nicht wieder völlig löst. Nach dem Filtrieren fügt man 150 $cm^3$ Kalihydrat in 300 $cm^3$ Wasser hinzu, füllt auf 1 *l* auf, fügt noch etwa 5 $cm^3$ Quecksilberchloridlösung hinzu und dekantiert nach Absetzen des Niederschlages. Vgl. auch *Fr. Tretzel*, Ein empfindliches Ammoniakreagens. Pharmaz. Ztg. Bd. **54**. S. 568 (1909).

[2]) *O. Folin*, Eine neue Methode zur Bestimmung des Ammoniaks im Harn und anderen tierischen Flüssigkeiten. Zeitschr. f. physiolog. Chemie. Bd. **37**. S. 161 (1902). — Vgl. auch *Ph. Schaffer*, On the quantitativ determination of ammonia in urine. Amer. Journ. of Physiol. Vol. 8. p. 330 (1903). — Vgl. ferner *Frenkel*, Die Bestimmung kleiner Mengen Ammoniak in Gegenwart von Harnstoff. Bull. Soc. Chim. Paris. [3.] T. **35**. p. 250 (1906); Chem. Zentralbl. Bd. **77**. I. S. 1631 (1906).

Die Ausführung geschieht folgendermaßen:

25 *cm*³ frischen Harn[1]) mißt man in einem Areometerzylinder von etwa 45 *cm* Höhe und 5 *cm* Durchmesser (der Zylinder kann auch kleiner sein), sodann fügt man 8—10 *g* Chlornatrium und um das Schäumen zu verhindern 5—10 *cm*³ Petroleum, Toluol oder Methylalkohol, auch Paraffinum liquidum[2]), zuletzt etwa 1 *g* getrocknetes Natriumkarbonat dem Harne zu. Ein starker Luftstrom wird nun durch den Harn geleitet, bis alles Ammoniak ausgetrieben ist, was bei 20—25° unter Anwendung von 600—700 *l* Luft pro Stunde eine bis anderthalb Stunde in Anspruch nimmt. Verfügt man nicht über eine so wirksame Luftpumpe oder verwendet man größere Harnmengen, so dauert die Übertreibung natürlich entsprechend länger. *K. O. Klercker* läßt den Luftstrom zuerst durch Schwefelsäure passieren, um ihn völlig ammoniakfrei zu machen. Die aus dem Harn ausströmende, ammoniakenthaltende Luft geht zuerst durch einen Baumwollpfropf, um etwa mitgerissenes Alkali zurückzuhalten und wird dann durch zwei $^1/_{10}$ Normalsäure enthaltende Vorlagen geleitet. Vorteilhaft ist das von *Folin* angegebene Absorptionsgefäß (Fig. 259), das erlaubt, alles Alkali in einer Vorlage (wenigstens bis zu 40 *cm*³ $^1/_{10}$ n-$NH_3$) aufzufangen.

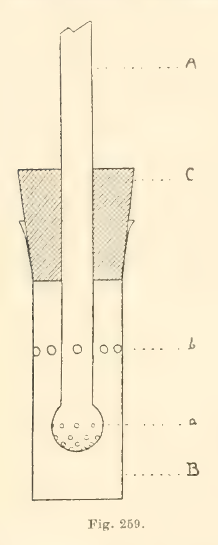


Fig. 259.

*A* ist ein Glasrohr von 8 *mm* Durchmesser, das bei *a* in eine kleine Kugel ausgeblasen ist, in welche mittelst eines erhitzten Platindrahtes 5 oder 6 kleine Öffnungen (von etwa 1 *mm* Durchmesser) gestoßen werden. *c* ist ein Gummistopfen, der in die zweite Röhre *B* paßt. *B* ist ein etwa 7·5 *cm* vom oberen Ende abgeschnittenes Reagenzglas (von 2·5 *cm* Durchmesser), in welchem sich bei *b* etwa 6—7 Öffnungen in einer Entfernung von 3 *cm* vom oberen Ende des Reagenzglases befinden, von derselben Größe oder besser etwas größer, als die Öffnungen bei *A*. Wenn die Röhren *A* und *B* durch Gummistopfen *C* zusammengefügt und in die Vorlage eingetaucht sind, so kommt die Ammoniak enthaltende Luft zuerst bei *a* und später auch bei *b* mit der Säure der Vorlage in Berührung.[3]) Als Indikator empfiehlt *Folin* Alizarinrot. (2 Tropfen einer 1⁰/₀igen Lösung auf 200—300 *cm*³ Flüssigkeit.) Man titriert bis zur Rotfärbung. Mäßige

[1]) Über Konservierung des Harnes vgl. Bd. I, S. 351; ferner die Arbeit von *F. V. Gill* und *H. S. Grindley*, The preservation of urine by thymol and refrigeration. Journ. Amer. chem. Soc. Vol. **31**. p. 695 (1909).

[2]) *K. O. af Klercker*, Kreatin und Kreatinin im Stoffwechsel. Biochem. Zeitschr. Bd. **3**. S. 45, 55 (1907).

[3]) Vgl. auch *R. O. Davis*, The determination of ammoniac without a condensor. Journ. Amer. chem. Soc. Vol. **31**. S. 556 (1909).

Mengen Kohlensäure, Ammonsalze, Methylalkohol, Toluol stören die Titration nicht. 1 *cm*³ $^1/_{10}$ n-Säure entsprechen 0·001703 *g* $NH_3$.

Oder man verschließt den Zylinder mit einem doppeltdurchbohrten Stopfen, in dessen einer Bohrung sich ein bis tief in die Harnflüssigkeit reichendes Glasrohr, rechtwinkelig gebogen, befindet, in der anderen Bohrung ein ebensolches Rohr, das nur einige Zentimeter unter dem Stopfen in den Zylinder reicht. Der äußere Teil dieses Rohres wird mit einem **U**-Röhrchen, mit loser Watte oder $CaCl_2$ gefüllt, und dieses wieder mit zwei je 20—40 *cm*³ $^1/_{10}$ Normalsäure und etwas Wasser enthaltenden Erlenmeyerkolben verbunden.[1])

Das Verfahren kann bei eiweißhaltigen Harnen direkt angewendet werden.

Bei der Anwendung dieser Methode zur Bestimmung des Ammoniaks im Blut werden 50 *cm*³ (ganz frisches) Blut in den in Eis gepackten Zylinder gefüllt, mit 16 *g* Kochsalz und zur Verminderung des Schäumens mit 25 *cm*³ Methylalkohol versetzt, zuletzt 2 *g* getrocknetes oder 5 *g* kristallisiertes Natriumkarbonat hinzugefügt. Nach den ersten zwei Stunden ist es notwendig, noch etwa 25 *cm*³ Methylalkohol der Blutprobe hinzuzufügen. Die Luftdurchleitung dauert 5 Stunden. Hier ist es zweckmäßig, die in der Vorlage zurückgehaltene Kohlensäure zu entfernen, u. zw. in der Weise, daß die Vorlage während der letzten 15 Minuten des Durchleitens von Luft in erwärmtes Wasser (von 30°) eingetaucht wird. Die störenden Mengen Kohlensäure werden dann von dem Luftstrom vollständig entfernt.[2])

### Methode von *Krüger-Reich*, modifiziert von *Schittenhelm*.[3])

Diese Methode verbindet die Vorteile der zuerst von *Boussingault* und *Wurster* empfohlenen Vakuumdestillation mit der der Zugabe von Natriumkarbonat und Kochsalz zu der zu untersuchenden Flüssigkeit.

Ausführung: 25—50 *cm*³ Harn (bzw. ammoniakhaltige Flüssigkeit; bei fester Konsistenz wird die Substanz mit $^1/_2$—1%iger Salzsäure gut verrieben und auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt) werden im Destillationskolben mit ca. 10 *g* Kochsalz versetzt, dann soviel trockenes Natriumkarbonat hinzugefügt, bis deutlich alkalische Reaktion vorhanden ist. (Meist genügt 1 *g*.) Hierauf

---

[1]) Dieser Anordnung bedient sich *Spaeth*, Chemische und mikroskopische Untersuchungen des Harnes. Leipzig 1908. S. 71.

[2]) Über die Anwendung der Methode bei Gegenwart von Magnesium- und Calciumsalzen; vgl. *Steel* und *Gies*, Journ. of Biol. Chem. Vol. **5**. p. 71 (1909) und *Ph. A. Kober*, Journ. Amer. chem. Soc. Vol. **30**. p. 1279 (1908). — Über eine Modifikation der *Folin*schen Methode vgl. *Ph. A. Kober*, Journ. Amer. chem. Soc. Vol. **30**. p. 1131 (1908).

[3]) *M. Krüger* und *O. Reich*, Zur Methodik der Bestimmung des Ammoniaks im Harne. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **39**. S. 165 (1903). — *A. Schittenhelm*, Zur Methodik der Ammoniakbestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **39**. S. 73 (1903). — *Boussingault*, Journ. f. prakt. Chem. Bd. **51**. S. 281 (1850); Ann. chim. phys. T. **29**. p. 479. — *C. Wurster*, Ammoniakbestimmung im Speichel und Harn. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **22**. S. 1889 (1903); Zentralbl. f. Physiologie. Bd. **1**. S. 485 (1887).

wird der Kolben ins Wasserbad gesetzt und mit der als Vorlage dienenden in Eiswasser ruhenden Peligotröhre verbunden. Die Peligotröhre (zwei aufrechtstehende, 4—4 $^1/_2$ *cm* weite, 25—30 *cm* hohe Glasröhren, die durch eine horizontal laufende, etwas engere Röhre, die in der Mitte eine kugelförmige Auftreibung hat, verbunden sind; sie hat einen Inhalt von ca. 340 *cm*$^3$) wird vorher mit 10—30 *cm*$^3$ $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure und einigen Tropfen Rosolsäure und Wasser beschickt, bis die Querverbindung vollkommen angefüllt ist. Der zweite Schenkel der Peligotröhre wird der Wasserpumpe angeschlossen und sofort so gut wie möglich evakuiert. Sobald das Vakuum den höchsten Grad erreicht hat, werden durch den am Kolben angebrachten Quetschhahn ca. 20 *cm*$^3$ Alkohol zugegeben und nun das Wasserbad auf eine Temperatur von 43° gebracht. In der Folge werden von 10 zu 10 Min. 15—20 *cm*$^3$ Alkohol zugegeben, eventuell auch noch 10—15 *cm*$^3$ Wasser,

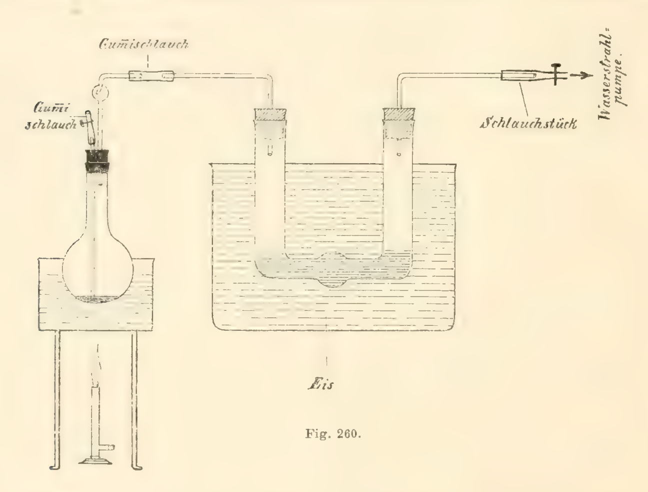



Fig. 260.

falls die Flüssigkeit zu rasch verdampft. Zum Schluß werden zur Verjagung der Wassertropfen in der Überleitungsröhre noch 10 *cm*$^3$ Alkohol zugegeben. Unter einem Druck von 30—40 *mm* Quecksilber ist die Bestimmung 17 Minuten nach Beginn des lebhaften Siedens gerechnet, zu Ende geführt. Es wird nun durch einen Quetschhahn die Wasserstrahlpumpe von der Peligotröhre abgeschlossen und darauf durch vorsichtiges Öffnen des am Kolben angebrachten Quetschhahnes die Luft langsam zum Einströmen gebracht. Die Temperatur des Wasserbades soll nicht 50° übersteigen und ist am besten dauernd auf 43—44° zu halten.

Die Anordnung der Apparatur zeigt Figur 260.

An Stelle der Peligotröhre kann man auch mit Vorteil zwei Vorlagen anwenden. Es ist auch praktisch, in der einen Bohrung des Gummistopfens am Destillationskolben einen Scheidetrichter anzubringen, durch welchen der Zufluß des Alkohols bequem durchgeführt werden kann.

Bei eiweißhaltigen Harnen sind diese vorher zu enteiweißen, wenn man nicht Natriumchlorid und Soda, sondern wie im ursprünglichen Verfahren von *Krüger-Reich* Kalkmilch verwendet. *Salkowski* verfährt hierbei so, daß er 100 $cm^3$ eiweißhaltigen Harn mit 20 *g* gepulvertem Kochsalz und darauf mit dem doppelten Volumen einer Mischung von 7 Volumen gesättigter Kochsalzlösung und 1 Volumen 30%iger Essigsäure versetzt, wiederholt stark schüttelt und nach 15—20 Minuten abfiltriert. Besser ist es nach *Krüger* und *Reich*, zu 100 $cm^3$ Harn 1 *g* gepulverte Zitronensäure und 0·5 *g* Pikrinsäure hinzuzufügen, kurze Zeit umzuschütteln, bis der Niederschlag sich in Flocken absetzt, und sofort durch ein Faltenfilter zu filtrieren. Zur Bindung der Zitronen- und der Pikrinsäure ist statt Kalkmilch 0·5 *g* Ätzbaryt zu verwenden.

*Schaffer* benutzt folgende Anordnung:

Zu 50 $cm^3$ Harn in *A* werden 15—20 *g* ClNa und ca. 50 $cm^3$ Methylalkohol gefügt. In der Flasche *B* sind 25 oder 50 $cm^3$ $^1/_{10}$ n-Säure, in *B'* 10 $cm^3$ $^1/_{10}$ n-Säure, in beiden Fällen mit wenig Wasser verdünnt. Wenn der Apparat zusammengesetzt ist, fügt man etwa 1 *g* trockenes $Na_2CO_3$ zu der Flüssigkeit in *A*, schließt und beginnt zu saugen (Fig. 261).

Die Vakuumdestillationsmethode läßt sich auch gut für die Ammoniakbestimmung in tierischen Geweben anwenden. *Grafe*[1]) wendet auf ca. 50 *g* Organsubstanz (auf 0·1 *g* genau abgewogen) 100 $cm^3$ kaltgesättigte Kochsalzlösung und 50 $cm^3$ Alkohol, 100 $cm^3$ ammoniakfreies destilliertes Wasser an; zuletzt werden 50 $cm^3$ kaltgesättigte Sodalösung zugefügt. Die Temperatur des Wasserbades beträgt höchstens 37—38°. Die Peligotröhre ist 26 *cm* hoch und faßt ungefähr 450 $cm^3$ Flüssigkeit; ihre der Wasserstrahlpumpe zugekehrte Hälfte ist erhöht. (Indikator: Lackmoid-Malachitgrün.) Bei 20 *mm* Hg beginnt schon nach einer Viertelstunde bei 25—28° Wasserbadtemperatur der Kolbeninhalt zu sieden. Es ist ratsam, in den ersten 3 Stunden nicht viel über diese Temperatur hinauszugehen. Nach 3 Stunden ist die Temperatur auf 36—37° zu steigern. Nach 6—7 Stunden, vom Beginn des Siedens gerechnet, ist die $NH_3$-Austreibung beendet. — Zur Verhinderung des Schäumens eiweißhaltiger Flüssigkeiten bei der Vakuumdestillation ist es oft vorteilhaft, die zu untersuchende Flüssigkeit durch einen Tropftrichter nur tropfenweise in den evakuierten Kolben einfließen zu lassen. Die entstehenden Blasen zerschellen sofort an der Luft.

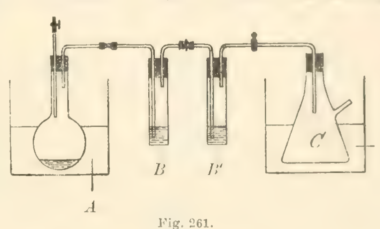


Fig. 261.

Vielfach verwandt wird auch die von *Nencki* und *Zaleski*[2]) gebrauchte ältere Anordnung zur Bestimmung des Ammoniaks im Blute und in den Geweben, die ebenfalls auf dem Prinzipe der Vakuumdestillation

[1]) *E. Grafe*, Methodisches zur Ammoniakbestimmung in tierischen Geweben. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48. S. 300 (1906).

[2]) *M. Nencki* und *J. Zaleski*, Über die Bestimmung des Ammoniaks in tierischen Flüssigkeiten und Geweben. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33. S. 193 (1901).

beruht. Zur Destillation dient ein konisches (siehe Fig. 262) dickwandiges Gefäß von 1·5—2 *l* Inhalt, das von 50—350 *cm*³ mit einer Graduierung versehen ist; die obere und untere Öffnung desselben haben 4 *cm* Durchmesser (die untere Öffnung dient nur der leichteren Reinigung des Gefäßes). Das Gefäß *B* von ca. 17 *mm* Durchmesser und ca. 42 *cm* Länge ist der Rezipient für die titrierte Schwefelsäure; *C* ist eine Waschflasche, *L* ein *Liebig*scher Kühler. Für die Bestimmung nimmt man vom Blut oder von serösen Flüssigkeiten 100 *cm*³, vom Harn 20—30 *cm*³, von den Geweben 40—50 *g*. Den Harn verdünnt man mit dem 3—5fachen Volumen Wasser. Das zu untersuchende Gewebe muß mit gereinigtem Seesand möglichst fein zerrieben und mit etwa 200 *cm*³ Wasser in dünnbreiige Emulsion überführt werden.

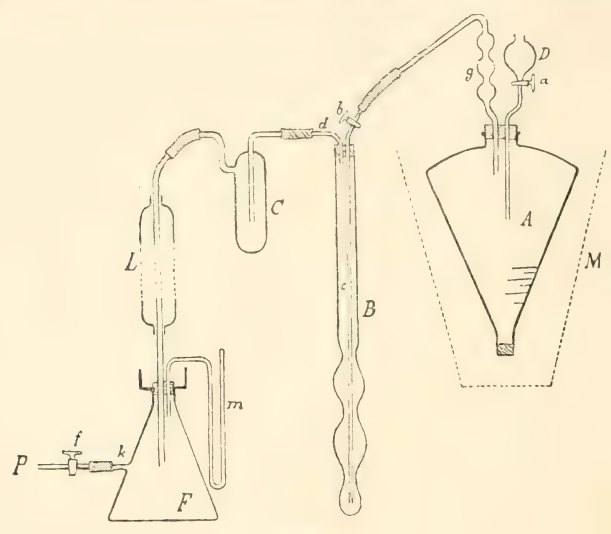



Fig. 262.

Die Bestimmung wird so ausgeführt, daß nach vorherigem Evakuieren des ganzen Apparates der Hahn *a* geschlossen, der Hahn *b* anfangs halb — um einem Übersteigen von Blasen vorzubeugen —, später ganz geöffnet wird. Außer der Wasserkühlung im Kühler kühlt man auch vorteilhaft das Gefäß *F* mit Schnee oder kaltem Wasser. Ist der Druck von 15—10 *mm* erreicht, so schließt man den Hahn *b* und läßt durch den Scheidetrichter *D* 50 *cm*³ Magnesiaemulsion zu. Dann öffnet man den Hahn *b* wieder und beginnt, nachdem die Gasentwicklung nachgelassen hat, mit dem Erwärmen des Wasserbades. Die Temperatur soll namentlich bei Destillation von Blut sehr langsam (2—4 Stunden bis 35°) gesteigert werden und soll während der

ganzen Zeit des Destillierens 35—37° betragen. Sind etwa $^2/_3$ der Flüssigkeit überdestilliert (in ca. 5—6 Stunden), so ist die Destillation beendigt. Zunächst wird die Kautschukverbindung zwischen *C* und *L* mittelst Klemmschraube wie auch der Hahn *b* geschlossen und durch *a* Luft in *A* eingelassen; dann wird die Kautschukverbindung zwischen *g* und *e* gelöst und durch vorsichtiges Öffnen des Hahnes *b* die Luft in *B* und *C* eingelassen. Der Inhalt von *B* und *C* wird in ein Becherglas gegossen, mit Wasser nachgespült und mit $^1/_{20}$ Normallauge unter Benutzung von Lackmoid-Malachitgrün als Indikator zurücktitriert.

*A. Steyrer*[1]) hat die Methode von *Nencki* folgendermaßen modifiziert: 20—30 *cm*³ Urin (je nach der Konzentration desselben) werden in den Kolben *A* gebracht (Fig. 263). Bis zum Boden desselben reicht ein am unteren Ende ausgezogenes Glasrohr *C*, das mittelst eines Druckschlauches mit einer Schwefel-

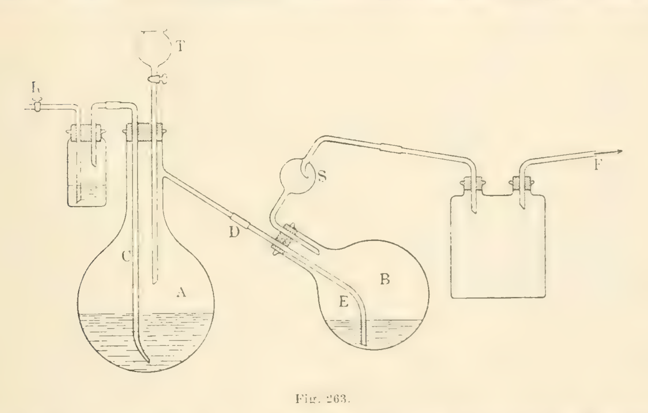



Fig. 263.

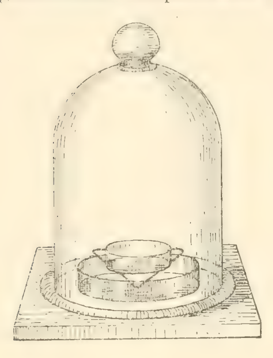
säureflasche verbunden ist. Ein Hahn *R* dient zur Regulierung des durchsaugenden Luftstromes. Durch einen luftdicht eingepaßten Tropftrichter *T* wird Kalkmilch (besser Magnesiaemulsion) zufließen gelassen. Die Vorlage *B*, die einen Überschuß von $^1/_4$ n-Säure enthält, wird gut gekühlt. Das Rohr *E* reicht bis an den Boden der Vorlage; bei *D* stößt es mit ausgeschliffenen Rändern an das Ableitungsrohr von *A* und ist dort mittelst Schlauch gut gedichtet. Die Kugel *S* wie die *Woulff*sche Flasche dienen dazu, einem etwaigen Verlust an Säure vorzubeugen. Das Endstück *F* wird mit einer stark saugenden Wasserstrahlpumpe in Verbindung gebracht. Der Apparat wird so in Gang gesetzt, daß zuerst 50 *cm*³ Magnesiaemulsion zu dem in *A* befindlichen Urin zufließen gelassen werden, der Hahn bei *T* wird sofort geschlossen und die Wasserstrahlpumpe in Gang gesetzt. Das Vakuum

[1]) *A. Steyrer*, Über osmotische Analyse des Harnes. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 2. S. 314 (1902).

beträgt 18—25 *mm* Hg. Der Kolben *A* wird in ein Wasserbad von ca. 36° gesenkt. Bei dieser Anordnung ist nach einer Stunde alles $NH_3$ überdestilliert. Bei eiweißhaltigen Harnen empfiehlt es sich, der Magnesiaemulsion etwas Alkohol zuzusetzen, wodurch das Schäumen der Flüssigkeit hintangehalten wird.

Nicht so genau wie die vorher beschriebenen Methoden, infolge ihrer Einfachheit namentlich bei klinischen Untersuchungen gut brauchbar ist die Ammoniakbestimmungsmethode von *Schlösing*.[1])

Das Prinzip der Methode ist, daß in einem geschlossenen Raume das aus der Flüssigkeit ausgetriebene Ammoniak von Schwefelsäure von bekanntem Gehalt aufgenommen wird. Unter einer Glasglocke (Fig. 264), die auf einer mattgeschliffenen Glasplatte mit Fett luftdicht angesetzt ist, befindet sich eine Schale mit 20 *cm*³ $^1/_{10}$ n-$H_2SO_4$; darüber auf einem Glasdreieck eine zweite Schale mit 20 *cm*³ des filtrierten, enteiweißten Harnes, dem einige Kristalle Thymol zugesetzt werden. Unmittelbar bevor man die Schalen mit der Glasglocke bedeckt, fügt man 20 *cm*³ Kalkmilch (1 Gew.-Teil Calciumhydrat mit 12 Gew.-Teil Wasser durchgeschüttelt) dem Harne zu. Nach 3 bis 4 Tagen titriert man die unverbrauchte Schwefelsäure mit $^1/_{10}$ Normallauge zurück (Rosolsäure oder Lackmus- oder Cochenilletinktur als Indikator). Ein eventueller Wandbeschlag ist abzuspülen und mitzutitrieren. 1 *cm*³ $^1/_{10}$ n-$H_2SO_4$ entsprechen 1·703 *mg* $NH_3$. Die Zeit, die nötig ist zur Abgabe (und zur Absorption) des Ammoniaks, hängt von der Tiefe der Flüssigkeit ab. Diese soll nach den Untersuchungen von *Schaffer* 2 *mm* nicht übersteigen; bei Anwendung von 25 *cm*³ Flüssigkeit wäre eine flache Dose von 12 *cm* Diameter anzuwenden. Brauchbare Resultate erhält man nach *Schaffer*, wenn man in folgender Weise verfährt: Zu dem filtrierten Urin wird Natriumkarbonat (zu 25 *cm*³ ca. 0·5 *g*) und Kochsalz in Überschuß (und einige Tropfen Chloroform oder Phenol oder F Na [2]) [5°/₀₀]) hinzugefügt; der Urin befindet sich in einer flachen Dose von 15—17 *cm* Diameter. Bei 20° ist die Austreibung des Ammoniaks in 3—4 Tagen fast beendet, bei 38° bereits in 48 Stunden. Bei längerem Stehen bei dieser Temperatur ist die Zersetzung jedoch beträchtlich.


Fig. 264.

[1]) *Schlösing*, Ann. chim. phys. T. **31**. S. 153 (1851); Journ. f. prakt. Chemie. Jg. **1851**. S. 372. — *Hallervorden*, Über das Verhalten des Ammoniaks im Organismus und seine Beziehungen zur Harnstoffbildung. Arch. f. exper. Pathol. Bd. **10**. S. 124 (1878). — *K. Bohland*, Die Harnstoffanalyse von *Bunsen* mit Berücksichtigung der N-haltigen Extraktivstoffe und der Ammoniaksalze im Harn des gesunden und fiebernden Menschen. *Pflügers* Arch. Bd. **43**. S. 30 (1891).

[2]) *M. Dehon*, Sur la technique de la détermination du coëfficient azoturique. Journ. de Physiologie. T. **7**. p. 497 (1905).

*Bohland* hat das Verfahren insofern modifiziert, daß er die Bestimmung in einem Vakuumexsikkator ausführt. Die Einführung der Kalkmilch erfolgt hier durch eine bis an den Boden des Exsikkators reichende, in den Harn tauchende Röhre mit Glashahn und Kugeltrichter.

Verwendung eiweißhaltigen Harnes ist wegen der leichten Zersetzbarkeit desselben nicht zulässig. Man entfernt das Eiweiß entweder nach *Salkowski*[1]), oder man kocht den mit 10—15 *cm*³ gesättigter Kochsalzlösung versetzten und schwach mit Essigsäure angesäuerten Harn. Fügt man statt Kalkmilch nach *Schaffer* dem Harn ca. 10 *g* Natriumchlorid und 0·5 *g* Soda zu, so ist die vorherige Entfernung von Eiweiß unnötig. Eine gewisse Vereinfachung der *Schlösing*schen Methode bei Ausführung der $NH_3$-Bestimmungen bringt nach *Durig*[2]) die Anwendung von Paraffinöl als Sperrflüssigkeit. Über gleichzeitige Bestimmung des Ammoniaks und des Harnstoffes nach *Spiro*[3]) siehe unten.

## Ammoniakbestimmung nach *Ronchèse-Malfatti*.[4])

Die Bestimmung beruht auf folgendem Prinzip. Wird eine neutrale Lösung eines Ammoniumsalzes durch Zusatz von Phenolphtalein und einigen Tropfen $^1/_{10}$ n-Lauge rötlich gefärbt, so verblaßt diese Färbung sofort auf Zusatz einer genügenden Menge ebenfalls gegen Phenolphtalein neutralisierten Formalins infolge Bildung von Hexamethylentetramin, und man muß eine der vorhandenen Ammoniummenge entsprechende Menge von Lauge hinzufügen, damit wieder Rötung eintritt; nach der Formel:

$$4\,NH_4Cl + 6\,CH_2O + 4\,NaOH = N_4(CH_2)_6 + 10\,H_2O + 4\,NaCl.$$

Für Harn wird die Methode nach *Malfatti* folgenderweise angewendet: 10 *cm*³ werden ungefähr auf das 5—6fache mit Wasser verdünnt und nach Zusatz stets gleicher Mengen von Phenolphtalein bis zu eben wahrnehmbarem Farbenumschlag mit $^1/_{10}$ n-Lauge titriert. Nach der so erfolgten Neutralisation fügt man 3 *cm*³ käufliches, vorher gegen Phenolphtalein neutralisiertes Formalin hinzu und titriert, nachdem die Färbung verschwunden ist, weiter, bis der gleiche Farbenwechsel wie vorher eintritt. Die nach Formalinzusatz verbrauchte Laugenmenge ergibt unmittelbar das vorhandene Ammonium in Kubikzentimeter $^1/_{10}$ n-Ammonium. War der Formalinzusatz genügend, so bringt ein weiterer Kubikzentimeter keine Farbenänderung

[1]) *E. Salkowski*, Über ein Verfahren zur völligen Abscheidung von Eiweiß ohne Erhitzen. Zentralbl. f. med. Wiss. Bd. **18**. S. 689 (1880); vgl. *W. Salomon*, *Virchows* Arch. Bd. **97**. S. 150 (1884).

[2]) *A. Durig*, Kleine Mitteilungen zur biochemischen Versuchsmethodik. Biochem. Zeitschr. Bd. **4**. S. 65 (1907).

[3]) *K. Spiro*, Zur Methodik der Ammoniak- und Harnstoffbestandteile im Harn. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **9**. S. 481.

[4]) *H. Malfatti*, Eine klinische Methode zur Bestimmung des Ammoniaks im Harn. Zeitschr. f. anal. Chem. Bd. **47**. S. 273 (1908). — *A. Ronchèse*, Neues Verfahren zur Bestimmung des Ammoniaks. Journ. Pharm. et Chim. [6.] T. **25**. p. 611 (1907) und Bull. Soc. Chim. de France. [4.] T. **1**. p. 900 (1907).

mehr hervor; andernfalls muß weiter titriert werden. War zu wenig Formalin zugesetzt worden, so erkennt man dies auch daran, daß die eben eingetretene schwache Rötung sich sehr bald zu deutlichem Rot verstärkt, während, wenn die Reaktion tatsächlich beendet ist, der entstandene Farbenton sich kaum mehr verändert. Wendet man eine 0·07143 n-Lauge an, so entsprechen von dieser 1 *cm*³ einem Milligramm N. Die Methode gibt, falls Aminosäuren anwesend sind, etwas zu hohe Werte (vgl. Abschnitt „Aminosäuren") an.

## Harnstoff, $CH_4N_2O$.

### Eigenschaften.

Der Harnstoff ist leicht löslich in Wasser (1:1), in Alkohol (1:5), unlöslich in Äther, Chloroform. Schmilzt bei 132°. Bildet lange, vierseitige, wasserfreie Prismen oder Nadeln. Das salpetersaure und das oxalsaure Salz ist in Wasser sehr wenig löslich. Mit Salzen (Chlornatrium, Chlorammonium), vielen Säuren, Metalloxyden (wie Quecksilberoxyd) bildet er Verbindungen. Eine Lösung von Harnstoff gibt mit salpetersaurem Quecksilberoxyd einen weißen flockigen Niederschlag.

### Nachweis.

1. Ein Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit (vorher stark eingeengter Harn) wird auf dem Objektträger mit einem Tropfen Salpetersäure zusammengebracht. Es entstehen Kristalle von salpetersaurem Harnstoff: unter dem Mikroskop rhombische oder sechsseitige Täfelchen.

2. Eine konzentrierte Harnstofflösung (Harn) wird mit gesättigter Oxalsäurelösung zusammengebracht; es scheidet sich oxalsaurer Harnstoff (prismatische Kristalle) aus.

Aus der alkoholischen Lösung wird Harnstoff durch eine ätherische Lösung von Oxalsäure gefällt (vgl. hierzu *Gottlieb*, *Lippich*[1]).

3. Harnstoff in einem Reagenzglas trocken geschmolzen, zersetzt sich unter Bildung von Biuret; es wird in wenig Wasser gelöst und mit der Lösung die Biuretreaktion angestellt (Rotfärbung mit Alkali- und Kupfersulfat).

4. Etwas Harnstoff wird mit einem Tropfen fast konzentrierter, frisch bereiteter Furfurollösung übergossen, gleich ein Tropfen Salzsäure von 1·10 spez. Gew. (20%) hinzugefügt; es tritt rasch eine gelbe, grün, blau, violett werdende, schließlich purpurviolette Färbung auf.[2])

Nach *Huppert*[3]) fügt man zu 2 *cm*³ konzentrierter Furfurollösung 4—6 Tropfen konzentrierter Salzsäure hinzu und trägt in dieses Gemenge, das sich nicht rot färben darf, einen kleinen Harnstoffkristall ein.

5. Versetzt man eine Lösung von Natriumnitrit mit einigen Tropfen Schwefelsäure bei Gegenwart von Harnstoff, so entwickeln sich farblose Gase (Stickstoff und Kohlensäure); bei Abwesenheit von Harnstoff entstehen hingegen gelbbraune Nitrosodämpfe.[4])

Zur Darstellung des Harnstoffs aus dem Harn gibt *Salkowski*[5]) folgende Vorschrift.[6]) 200—300 *cm*³ Hundeharn oder das Doppelte

[1]) *Lippich*, Über die Isolierung reinen Harnstoffs aus menschlichem Harn. Zeitschrift f. physiol. Chem. Bd. 48. S. 160 (1906).

[2]) *Schiff*, Eine Harnstoffreaktion. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **10**. S. 773 (1877).

[3]) Analyse des Harns. S. 296 (1898).

[4]) Vgl. *Thierfelder*, *Hoppe-Seylers* Handbuch d.r phys. und pathol.-chemischen Analyse. 8. Aufl. S. 148 (1909).

[5]) Praktikum d. phys. u. path. Chemie. 3. Aufl. Berlin 1906. S. 165.

[6]) Über Nachweis und Bestimmung von Harnstoff in serösen Flüssigkeiten und Organextrakten vgl. auch *Salkowski*, Arb. a. d. pathol. Inst. Berlin 1906. S. 581 (Hirschwald).

menschlichen Harnes werden mit Barytmischung (1 Volumen gesättigte Bariumnitratlösung, 2 Volumen Barytwasser) so lange gefällt, bis eine Probe des Filtrates mit Barytmischung keinen Niederschlag mehr gibt, von dem entstandenen Niederschlag wird abfiltriert, einmal nachgewaschen, das Filtrat zuerst auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbad zum Sirup eingedampft, mit etwa 150 $cm^3$ Alkohol gefällt, nach halbstündigem Stehen von dem Niederschlag abfiltriert, das Filtrat auf dem Wasserbad möglichst vollständig verdampft und nach dem Erkalten mit dem doppelten Volumen Salpetersäure oder etwas mehr durchgerührt. Der entstandene salpetersaure Harnstoff wird, am besten am nächsten Tage, abfiltriert, mit wenig kalter Salpetersäure gewaschen, auf einer Tonplatte getrocknet. Zur Überführung des salpetersauren Harnstoffs in Harnstoff wird der salpetersaure Harnstoff in einer Schale mit Wasser übergossen, dann in kleinen Portionen Bariumkarbonat hinzugefügt, gut umgerührt, erwärmt und so lange Bariumkarbonat zugesetzt, bis die Flüssigkeit nicht mehr sauer reagiert, filtriert und einmal nachgewaschen. Das meist gelblich gefärbte Filtrat wird mit Tierkohle entfärbt, wieder filtriert, das Filtrat zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit Alkohol ausgezogen, die alkoholische Lösung filtriert, eingedampft. Der Harnstoff kristallisiert aus und wird aus absolutem Alkohol umkristallisiert.

Zur möglichst quantitativen Isolierung von sehr geringen Mengen von Harnstoff aus Blut, Galle, Milch oder aus Organen soll man nach *Hoppe-Seyler* folgenderweise verfahren.[1]) Die nötigenfalls bei mäßiger Wärme etwas eingeengte Flüssigkeit oder das zu untersuchende, frische, schnell zerkleinerte Organ oder frisches Blut werden mit dem drei- bis vierfachen Volumen starken Alkohols gut gemischt und 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen. Man filtriert, wäscht den Rückstand mehrmals mit Alkohol, engt die vereinigten Filtrate bei ca. 50° ein, säuert nach dem Erkalten mit Essigsäure stark an, fügt Chloroform hinzu, schüttelt gut und trennt im Scheidetrichter beide Flüssigkeiten. Die Chloroformlösung (die Lecithin, Seifen, Fette, Cholesterin aufnimmt) wird mit Wasser gewaschen und die Waschflüssigkeit mit der übrigen alkoholisch-wässerigen Lösung vereinigt. Die wässerig-alkoholische Lösung wird nun durch Abdampfen bei mäßiger Wärme von Alkohol befreit, mit Schwefelsäure nach dem Erkalten stark sauer gemacht und zur Entfernung von Pepton, Kreatinin etc. mit Phosphorwolframsäure gefällt, so lange ein Niederschlag entsteht. Den Niederschlag wäscht man einige Male mit schwefelsäurehaltigem Wasser, übersättigt die vereinigten Filtrate mit Barytwasser, entfernt den Überschuß durch Einleiten von $CO_2$, filtriert, dampft auf ein kleines Volumen bei mäßiger Wärme ein und scheidet den Harnstoff mit salpetersaurem Quecksilberoxyd ab; die Flüssigkeit wird bis zum Ende mit Barytwasser schwach sauer erhalten. Schließlich wird mit ein paar Tropfen Barytwasser fast neutralisiert (nicht alkalisch gemacht), der Niederschlag abfiltriert, einige Male mit wenig Wasser gewaschen, mit

[1]) Genau nach *Thierfelder*, l. c. 8. Aufl. S. 651.

dem Filter in etwas Wasser zerteilt, mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Quecksilbersulfid, das außer vielleicht etwas salpetersaurem Baryt nur salpetersauren Harnstoff enthalten soll, wird zur Austreibung des Schwefelwasserstoffs auf dem Wasserbade erwärmt, nach Zusatz von Bariumkarbonat bei mäßiger Wärme zur Trockne verdampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol extrahiert und filtriert. Um eventuell in Lösung gegangene kleine Mengen von salpetersaurem Baryt zu entfernen, fügt man das gleiche Volumen Essigäther hinzu, filtriert und engt das Filtrat zur Trockne ein. Nach wiederholtem Lösen in Alkohol und Fällen mit Essigäther ist der salpetersaure Baryt völlig entfernt, dann kristallisiert der Harnstoff beim Verdunsten aus.

Etwas abweichend verfährt *Gottlieb*.[1]) Sein Prinzip beruht darauf, daß der oxalsaure Harnstoff leicht löslich in Wasser, ziemlich leicht löslich in Alkohol, sehr wenig löslich in wasser- und alkoholfreiem Äther ist.

Aus dem alkoholisch-ätherischen Filtrat läßt sich der Harnstoff bei Bearbeitung des Blutes sehr schön rein gewinnen, während der aus den Organen gewonnene meist nicht völlig von Beimengungen zu trennen ist. Um in diesem Falle die Menge des Harnstoffs zu ermitteln, wird der Harnstoff wie oben mit salpetersaurem Quecksilberoxyd bei ganz schwach saurer Reaktion gefällt; den gut ausgewaschenen Niederschlag zerlegt man mit $H_2S$, entfernt letzteren durch Durchsaugen von Luft und die bei der Zerlegung des Niederschlages freigewordene $HNO_3$ durch Baryt, endlich den Barytüberschuß durch Einleiten von $CO_2$. Das Filtrat wird eingedunstet, ein- oder mehrmals mit Alkohol aufgenommen und mit dem gleichen Volumen Essigäther versetzt, der aus dem alkoholischen Filtrat gewonnene, noch nicht ganz reine Harnstoff nochmals in Alkohol gelöst und mit etwas mehr als zur Fällung nötiger ätherischer Oxalsäurelösung versetzt, die Flüssigkeit verdunstet, der Rückstand auf dem Filter mit alkohol- und wasserfreiem Äther zur Entfernung der überschüssigen Oxalsäure ausgewaschen, in Wasser gelöst und in der wässerigen Lösung die an Harnstoff gebundene Oxalsäure durch Titration mit $^1/_{20}$ n-Barytlösung bestimmt. 1 $cm^3$ $^1/_{20}$ n-Barytlösung entspricht 3 *mg* Harnstoff. Entsprechend der Löslichkeit des oxalsauren Harnstoffes im wasser- und alkoholfreien Äther ist für 10 $cm^3$ wasser- und alkoholfreien Waschäther 0·1 *mg* Harnstoff zu dem erhaltenen Harnstoffwert hinzuzuaddieren.

Quantitative Bestimmung.

Methode von *Mörner-Sjöquist* (mit der Modifikation von *Braunstein*).[2])

Bei dieser Methode werden die stickstoffhaltigen Bestandteile des Harns mit Ausnahme von Harnstoff, Ammonsalzen, Hippursäure durch eine

[1]) *R. Gottlieb,* Über die quantitative Bestimmung des Harnstoffs in den Geweben und den Harnstoffgehalt der Leber. Arch. f. exper. Pathol. Bd. **42**. S. 238 (1908); vgl. auch *E. Brücke.* Sitzungsber. d. kais. Akad. d. Wiss. zu Wien. Bd. **85** (1882).

[2]) *K. A. H. Mörner-J. Sjöquist,* Eine Harnstoffbestimmungsmethode. Skand. Arch. f. Physiol. Bd. **2**. S. 438 (1891). — Derselbe, Zur Bestimmung des Harnstoffs im Menschenharn. Ebenda. Bd. **14**. S. 297 (1903). — *Al. Braunstein,* Über die Harnstoffbestandteile im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **31**. S. 381 (1901).

konzentrierte Lösung von Bariumchlorid und Barythydrat unter Zusatz von Alkoholäther gefällt und der Harnstoff-Stickstoff nach Vertreibung des präformierten Ammoniaks nach *Kjeldahl* bestimmt.

Als Reagenzien werden dazu benutzt: 1. eine gesättigte Bariumchloridlösung, die 5% Barythydrat enthält; 2. eine Mischung von 2 Teilen 90%igem Alkohol[1]) und von 1 Teil Äther.

Die Ausführung der Methode ist die folgende:

5 *cm*³ Harn werden in einer enghalsigen Flasche mit eingeschliffenem Stöpsel mit 5 *cm*³ der Mischung von Bariumchlorid und Barythydrat und mit 100 *cm*³ der Alkohol-Äthermischung gefällt und das Gefäß verschlossen. Am folgenden Tage wird die Flüssigkeit filtriert, der Niederschlag 6—7mal mit etwa 50 *cm*³ Alkohol-Äthermischung ausgewaschen und das Filtrat bei einer 55° nicht übersteigenden Temperatur auf dem Wasserbad auf zirka 20—25 *cm*³ eingedampft. Nach dem Verjagen des Alkoholäthers wird etwas Wasser und eine Messerspitze (0·2—0·3 *g*) MgO zugesetzt, die Flüssigkeit weiter eingedampft, bis die Dämpfe keine alkalische Reaktion mehr zeigen. Die bis auf 10—15 *cm*³ eingeengte Flüssigkeit wird in einen kleinen Erlenmeyerkolben übergeführt, in welchen vorher 10 *g* kristallisierte Phosphorsäure gegeben sind. Das Gemisch wird in einem Luftbad 4½ Stunden — von der Zeit an gerechnet, wo alles Wasser verdunstet ist — bei 140—145° (nicht über 150°) erhitzt. Bei dieser Temperatur wird die Hippursäure nicht zerlegt, und der durch die Fällung der Hippursäure bedingte Fehler fällt fort. Die Verdampfung des Wassers nimmt nicht mehr als eine Stunde in Anspruch. Nach dem Erkalten wird der Rückstand in Wasser gelöst, die Lösung quantitativ in den Kjeldahlkolben übergeführt, mit Kalilauge alkalisch gemacht und das Ammoniak in die titrierte Schwefelsäure abdestilliert. Die Zugabe von 60—70 *cm*³ einer 28%igen Lauge der aufgeschlossenen Flüssigkeit genügt.

Durch Multiplikation des gefundenen Stickstoffwertes mit 2·143 erhält man die in 5 *cm*³ Harn enthaltene Harnstoffmenge (1 *cm*³ $^1/_{10}$-n-Säure = 0·001401 *g* N = 0·003 *g* Harnstoff).

Durch Fällen mit Bariumchlorid und Barythydrat und Alkoholäther werden entfernt: Harnsäure, Purinbasen, Oxyproteinsäure, Ammoniak, Farbstoffe, Eiweißkörper, Tyrosin, Allantoin bis auf geringe Mengen.[2]) Die zurückbleibenden Stoffe: Kreatinin, Hippursäure, Gallensäuren, Aminosäuren üben nur einen geringen Einfluß auf den Harnstoffwert aus. Kynurensäure ist auch ohne Einfluß.

Ist der zu untersuchende Harn sehr arm an Hippursäure, so kann ohne wesentlichen Fehler die Bestimmung auch nach der ursprünglichen

---

[1]) *Eg. Bödtker*, Notiz zu der Harnstoffbestimmung von *K. A. Mörner* und *Sjöqvist*. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **17**. S. 140 (1893). — *Salaskin* und *Zaleski*, Über die Harnstoffbestimmung im Harne. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28. S. 73 (1899).

[2]) Bezüglich des durch das Allantoin bedingten Fehlers vgl. auch u. a. *A. Schittenhelm*, Über die Umsetzung verfütterter Nukleinsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **62**. S. 80 (1909).

Vorschrift von *Mörner-Sjöqvist* ausgeführt werden, in der Weise, daß die nach Verjagen des Alkoholäthers und des Ammoniaks zurückbleibende Flüssigkeit samt Niederschlag in einen Kjeldahlkolben gespült, zuerst mit etwas verdünnter, dann mit 10 $cm^3$ konzentrierter Schwefelsäure versetzt und der Stickstoff wie üblich nach *Kjeldahl* bestimmt wird.

Nimmt man stets 9 $cm^3$ Harn in Arbeit und fügt 9 $cm^3$ Barytmischung und 207 $cm^3$ Alkohol-Äthermischung hinzu, so entsprechen 75 $cm^3$ des Filtrates 3 $cm^3$ Harn, und das lästige Nachwaschen bleibt fort *(Folin)*. Wo man eine Wasserstrahlpumpe zur Verfügung hat, ist es vorteilhaft, das Vertreiben des Alkoholäthers unter vermindertem Druck mit Durchleitung eines schwachen Luftstromes vorzunehmen. *Salaskin* und *Zaleski* verfahren hierbei so, daß das untere Ende des die Luft zuleitenden Rohres 1—2 *cm* von der Oberfläche der Flüssigkeit sich befindet. Die Luft passiert ein mit Schwefelsäure und ein auf 80—90° erwärmtes leeres Reservoir. Das Gefäß mit der Flüssigkeit steht in einem höchstens auf 40° erwärmten Wasserbad.

### Methode von *Folin*.[1])

Prinzip. Kristallisiertes Magnesiumchlorid ($MgCl_2 . 6H_2O$) schmilzt in seinem Kristallwasser bei 112—115° und die so erhaltene Lösung hat einen Siedepunkt von ca. 160°. Eine solche siedende Lösung bewirkt eine quantitative Spaltung des Harnstoffes binnen einer halben Stunde.

Ausführung: 3 $cm^3$ Harnstofflösung werden in einem Erlenmeyerkolben von 200 $cm^3$ Inhalt abgemessen, und dieser 2 $cm^3$ konzentrierte Salzsäure (spez. Gew. 1·140) und 20 *g* $MgCl_2$ zugesetzt. Die Mischung am Rückflußkühler (am besten von 10 *mm* Innendurchmesser und 200 *mm* Länge) wird, um das überschüssige Wasser zu entfernen, lebhaft gekocht, bis die zurückfließenden Tropfen von Salzsäure und Wasser ein Zischen bewirken, dann wird das Kochen gelinde, ca. 45—60 Minuten, fortgesetzt. Um das Entweichen der zugesetzten Salzsäure zu verhindern, ist es gut, auf alle Fälle ein Sicherheitsrohr (siehe Fig. 265) an dem Kühler anzubringen. Die heiße Mischung wird sofort mit Wasser verdünnt, in einen Literkolben gespült, mit Wasser zu ca. 500 $cm^3$ verdünnt, eine Messerspitze Talcum und 7—8 $cm^3$ 20%ige Natronlauge zugesetzt, das abdestillierte Ammoniak wird titriert. Die Abdestillation von $NH_3$ dauert infolge der Gegenwart von Magnesiumsalzen länger: 60—70 Minuten.[2]) Das Magnesiumchlorid des Handels ist nie ammoniakfrei: *Mörner* fand in verschiedenen Proben eine 0·24 bis 0·8 $cm^3$ $^1/_{10}$ n entsprechende Menge auf 20 *g* des Salzes.[3]) Es muß daher

[1]) *Folin*, Eine neue Methode zur Bestimmung des Harnstoffs im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **32**. S. 504 (1901); Bd. **36**. S. 333 (1902).

[2]) Siehe hierzu die Arbeiten von *Steel* und *Gies*, Some notes of the efficiency of the *Folin* method etc. Journ. of Biol. Chem. Vol. **5**. p. 71 (1908) und *Ph. A. Kober*, Journ. Amer. Chem. Soc. Vol. **30**. p. 1279 (1908).

[3]) Eine Modifikation der *Mörner-Folin*schen Methode gibt *H. D. Haskins*, Preliminary communication of a method for estimating urea. Journ. f. Biol. Chem. Vol. **2**. S. 243 (1906/7).

der Ammoniakgehalt desselben bestimmt und eine entsprechende Korrektur angebracht werden. *L. G. de Saint-Martin*[1]) schlägt vor, statt des Magnesiumchlorids, das die Dauer der Destillation unangenehm verlängert, das (ammoniakfreie) Lithiumchlorid anzuwenden. Auf 5 $cm^3$ Harn kommen 5 *g* Lithiumchlorid.

Bei der Untersuchung des Harnes ist es besser, diesen vorher mit Salzsäure zur Trockene einzuengen. Man kann jedoch auch direkt verfahren: 3 $cm^3$ Harn (oder besser eine größere Menge: 5 $cm^3$) werden mit 20 *g* $MgCl_2$ und 2 $cm^3$ konzentrierter Salzsäure in einem Erlenmeyerkolben von 200 $cm^3$ Inhalt an einem kurzen Rückflußkühler (von 200 *mm* Länge und 10 *mm* Innendurchmesser) mit einem Sicherheitsrohr von obenstehender Form 10 Minuten gekocht, dann weitere 45—60 Minuten gelind erhitzt und weiter wie oben behandelt. Für das präformierte Ammoniak des Harnes ist eine Korrektur anzubringen. Beim Kochen des Harnes ist es vorteilhaft, ein Stück Paraffin (doppelt so groß wie eine Kaffeebohne) zuzusetzen, um das Schäumen zu verhindern. Anwesenheit von Harnsäure, Hippursäure, Kreatinin beeinflussen die Richtigkeit der Bestimmung nicht.

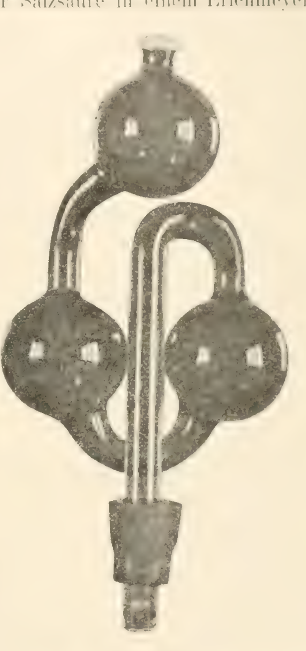


Fig. 265.

Vorteilhaft läßt sich die Methode auch mit der *Mörner*schen kombinieren. Bei dem letzteren Verfahren wird die Oxyproteinsäure mit entfernt; die Hippursäure wird durch Anwendung der *Braunstein*schen Modifikation eliminiert, sie kommt auch (ebenso wie das Allantoin) für Menschenharn nicht sehr in Betracht. Hingegen kann durch Kreatinin bedingte Erhöhung der Werte durch die Modifikation von *Braunstein* nur zum Teil beseitigt werden. Dies erreicht man besser durch die Kombination mit der *Folin*schen Methode. Dabei wird wie bei dem ursprünglichen *Mörner*schen Verfahren zunächst mit Bariumchlorid und Barythydrat und Alkoholäther gefällt. (Statt dessen ist namentlich bei Anwesenheit von Zucker[2]) die

[1]) *L. G. de Saint-Martin*, Modification du procédé de *Folin* pour le dosage de l'urée dans l'urine. Compt. rend. de soc. biol. T. **58**. S. 89 (1905); vgl. *Schlösing*, Compt. rend. T. **103**. p. 227.

[2]) *L. v. Udránszky*, Über die Beziehungen der in dem Harn bereits vorgebildeten oder daraus durch einfache Prozedur darstellbaren Farbstoffe zu Huminsubstanzen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **12**. S. 33, 42 (1888). — *Schoorl*, Chem. Zentralbl. Jg. **1903**. I. S. 1079.

Fällung mit gepulvertem Barythydrat — etwa 1·5 bis 2 *g* — zu empfehlen.) Nach 24 Stunden filtriert man in einen Jenenser Rundkolben, wäscht mit Alkoholäther gut aus, destilliert im Vakuum bei ca. 55° bis auf wenige Kubikzentimeter ab, fügt ca. 25 *cm*³ Wasser und etwas MgO zu der Flüssigkeit und engt weiter ein, bis alles Ammoniak ausgetrieben ist und die Dämpfe keine alkalische Reaktion mehr zeigen (etwa auf 10—15 *cm*³). Die Flüssigkeit wird nun bei Gegenwart einer hinreichenden Menge Salzsäure (für 5 *cm*³ Harn 2 *cm*³ HCl von 1·124 spez. Gew.) im Zersetzungskolben auf dem Wasserbade eingetrocknet, bis der Inhalt nahezu trocken ist. Dann erst wird im Kolben nach Zusatz von 20 *g* kristallisiertem $MgCl_2$ und 2 *cm*³ konzentrierter Salzsäure die Zersetzung vorgenommen. Der Zersetzungskolben wird nach *Mörner* vorteilhaft mit einem eingeschliffenen Glasstopfen verschlossen, der ein gebogenes Ableitungsrohr trägt und dieses wird mit einem *Liebig*schen Rückflußkühler verbunden. Oder man verbindet das Ableitungsrohr mit einem aufrecht stehenden, 50 *cm* langen Glasrohr; das obere Ende dieses Glasrohres steht, um die entweichenden Salzsäuredämpfe festzuhalten, mit einer Wasser enthaltenden Vorlage in Verbindung. Das Kochen geschieht auf dem Drahtnetz über einer kleinen Gasflamme: die Dauer desselben beträgt 2 Stunden.[1]) Nachher wird die noch flüssige Masse auf etwa ³/₄—1 *l* mit Wasser verdünnt, nach Zusatz von 22 *cm*³ 10⁰/₀iger Natronlauge und Talk destilliert. Nach Aufkochen des Destillates titriert man, um die Kohlensäure zu entfernen (nach dem Abkühlen), mit Lackmoid-Malachitgrün. Die Anwendung von allzuviel Lauge ist wegen der Ausscheidung von Magnesiumhydrat unangenehm. Die Destillation dauert lange, selten weniger als eine Stunde.[2])

— *A. Landau*, Über die Stickstoffverteilung im Harne des gesunden Menschen. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. **79**. S. 417 (1904) (*Malys* Jahrb. S. 458 [1903]). — *M. Dehon*, Sur la technique de la détermination du coëfficient azoturique. Journ. de Physiologie. T. **7**. p. 497 (1905).

[1]) *C. J. C. van Hoogenhuyze* und *H. Verploegh*, Weitere Beobachtungen über die Kreatininausscheidung beim Menschen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **57**. S. 166 (1908).

[2]) Vgl. zu der *Folin*schen Methode: *C. G. L. Wolf* und *E. Osterberg*, The determination of urea in the urine. Journ. Amer. chem. Soc. Vol. **31**. p. 421 (1909). — *Ronchèse*, Bull. Soc. chim. [4.] Tom. **3**. p. 1138 (1908). — *P. A. Levene* und *G. M. Meyer* (The determination of urea in urines. Journ. Amer. chem. Soc. Vol. **31**. p. 717 [1909]) verfahren bei der Harnstoffbestimmung in Anwendung der von *S. R. Benedict* und *Fr. Gephart* empfohlenen Methode (The estimation of urea in urine. Journ. Amer. chem. Soc. Vol. **30**. S. 1760 (1909) wie folgt: 12·5 *cm*³ Urin werden in eine Meßflasche von 50 *cm*³ gefüllt und mit einer 10⁰/₀igen Phosphorwolframsäurelösung in 10⁰/₀ Schwefelsäure vollständig gefällt. Nach 24stündigem Stehen wird das Volumen mit 10⁰/₀iger $H_2SO_4$ auf 50 *cm*³ aufgefüllt, durch ein trockenes Filter in eine trockene Flasche filtriert und je 20 *cm*³ (= 5 *cm*³ Urin) werden im Autoklaven 1¹/₂ Stunden bei 150° mit verdünnter HCl oder 10⁰/₀ $H_2SO_4$ hydrolysiert. Zum Schluß wird das $NH_3$ nach Zusatz von Natronlauge (40 *cm*³, 10⁰/₀) in die titrierte Säure destilliert. Über eine automatische Pipette für Ätznatronlösungen vgl. *F. G. Benedict*, Journ. Amer. chem. Soc. Vol. **31**. p. 652 (1909). — Vgl. auch: *H. D. Haskins*, Preliminary communication of a method of estimating urea. Journ. of Biol. Chem. Vol. **2**. p. 243 (1906/7). Ferner: *F. W. Gill*, *F. G. Allison* und *H. S. Grindley*, Journ. Amer. chem. Soc. Vol. **31**. p. 1078 (1909).

Es ist in vielen Fällen vorteilhaft, die Fällung mit Alkoholäther erst nach der quantitativen Vertreibung des Ammoniaks nach *Folin* vorzunehmen. *Spiro*[1]) verfährt dabei so: 25 *cm*³ Harn werden in einem hohen schmalen Standgefäß, das bei 270 bzw. 400 *cm*³ Marken trägt, mit 1½ *g* Baryt und einer niedrigen Schicht Petroleum (oder Toluol, oder Alkohol) versetzt. Das Gefäß trägt oben einen doppelt durchbohrten Gummistopfen, durch dessen eine Öffnung die ammoniakfreie Luft bis auf den Boden des Gefäßes geführt wird. Durch seine andere Bohrung geht ein mit Sicherung versehenes Glasrohr, das oben ein mit Glaswolle und Glasperlen versehenes Rohr trägt, das wiederum luftdicht mit der Vorlage verbunden ist. Für das Einleiten des Luftstromes in die vorgelegte Säure hat sich die feinlöcherige Glasröhre von *Folin* gut bewährt. Nachdem alles Ammoniak abdestilliert ist, wird das Glasrohr etc. mit Alkohol ausgespült, mit Alkohol bis zur Marke 270, mit Äther bis zur Marke 400 aufgefüllt, der Zylinder zugekorkt, gut durchgeschüttelt, stehen gelassen. Die Stickstoffbestimmung kann in der ganzen Lösung oder im aliquoten Teil durchgeführt werden.

### Verfahren von *Pflüger-Bleibtreu*, modifiziert von *Gumlich* und *Schöndorff*.[2])

Prinzip der Methode. Die stickstoffhaltigen Körper außer Harnstoff werden mit salzsäurehaltiger Phosphorwolframsäure gefällt, und in dem durch Calciumhydroxyd neutralisierten Filtrate zerlegt man den Harnstoff durch Erhitzen mit Phosphorsäure und bestimmt das abgespaltete Ammoniak.

Die erforderlichen Reagenzien sind: 1. Eine Mischung von 9 Teilen 10%iger Phosphorwolframsäure und 1 Teil Salzsäure vom spez. Gewicht 1·124; 2. Kalkhydratpulver, hergestellt durch Vermischen von Calciumoxyd mit Wasser, Trocknen und Pulverisieren; 3. kristallisierte Phosphorsäure.

Die Ausführung der Bestimmung geschieht in folgender Weise:

Ein Volumen Harn (50—100 *cm*³) etc. wird mit 2 Volumina Phosphorwolframsäure-HCl-Mischung versetzt und geschüttelt. Nach 5 Minuten wird eine kleine Probe abfiltriert und noch mit 1 Volumen Säuremischung versetzt; die Probe muß zwei Minuten klar bleiben. Entsteht eine Trübung, so nimmt man 3 Volumina Säuremischung. Oder man titriert 10 *cm*³ Harn vorher mit der Phosphorwolframsäure-Lösung, bis 1 *cm*³ des klaren Filtrates mit 3 Tropfen der Phosphorwolframsäure-Mischung nach 2 Minuten keine Trübung mehr gibt. Auf später entstehende Trübung ist keine Rücksicht zu

[1]) *Spiro*, Zur Methodik der Ammoniak- und Harnstoffbestimmung im Harn. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **9**. S. 481 (1907). Vgl. jedoch hierzu: *P. E. Howe* und *P. B. Hawk*, Vergleichende Untersuchungen etc. Journ. of Biol. chem. Vol. 5. p. 477 (1909).

[2]) *E. Pflüger* und *K. Bohland*, Verbesserung der Harnstoffanalyse von *Bunsen* mit Berücksichtigung der stickstoffhaltigen Extraktivstoffe *Pflügers* Archiv. Bd. **38**. S. 575 (1886). — *G. Gumlich*, Über die Ausscheidung des Stickstoffs im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **17**. S. 10 (1893). — *E. Pflüger* und *L. Bleibtreu*, Die quantitative Analyse des Harnstoffs im menschlichen Harne durch Phosphorwolframsäure. *Pflügers* Archiv. Bd. **44**. S. 78 (1889). — *B. Schöndorff*, In welcher Weise beeinflußt die Eiweißnahrung den Eiweißstoffwechsel der tierischen Zelle. *Pflügers* Archiv. Bd. **54**. S. 420 (1893).

nehmen. Diese Mischung, mit verdünnter $2^1/_2{}^0/_0$iger HCl auf 150 bzw. 300 aufgefüllt, bleibt 24 Stunden in einer verschlossenen Flasche stehen, nach 24 Stunden wird abfiltriert (am besten durch einen doppelten Filter aus echt schwedischem Papier, Munktell I), das Filtrat mit Kalkhydratpulver bis zur alkalischen Reaktion in einer Reibschale verrieben, filtriert. Eine eventuell auftretende Blaufärbung muß vor dem Filtrieren verschwinden, was oft mehrere Stunden in Anspruch nimmt (ein Teil, z. B. 10 *cm*³ des Harnes entsprechende Menge des Filtrates wird zur $NH_3$-Bestimmung nach *Schlösing* benutzt; falls die benutzte Phosphorwolframsäure alles $NH_3$ fällt, ist dies nicht nötig). Zur Bestimmung des aus dem Harnstoff stammenden Ammoniaks wägt man an einer Schnellwage 10 *g* kristallisierte Phosphorsäure ab, bringt diese in ein Erlenmeyerkölbchen. In die mit Phosphorsäure beschickten Kölbchen läßt man aus einer Bürette eine entsprechende Menge des Filtrates (10 *cm*³ des Harnes entsprechend) laufen und erhitzt diese in einem Trockenschranke $4^1/_2$ Stunden auf 150° — vom Augenblick an gerechnet, wenn alles Wasser verdünnt ist. Nach dem Erkalten wird die sirupartige Masse in warmem Wasser gelöst, in den Destillierkolben übergeführt, mit 70 *cm*³ Na OH, D. 1·25, versetzt und überdestilliert. Indikator: Cochenille. 1 *cm*³ $^1/_{10}$ n-Säure = 1·401 *mg* N = 3 *mg* Harnstoff. Bei der Methode ist zu beachten: die benutzte Phosphorwolframsäure darf in reinen Harnstofflösungen von 2—4% auch nach längerem Stehen keine Fällung geben; konzentrierte Harne (über 1·017 spez. Gew.) mit hohem Harnstoffgehalt sind auf das 5—10fache zu verdünnen (*Gumlich*). Der Harn soll höchstens 2% Harnstoff enthalten.

Durch Phosphorwolframsäure werden nicht gefällt: Oxyproteinsäure (dadurch wird der Harnstoffstickstoff um ca. 1% zu hoch gefunden), Allantoin, Oxalursäure, Kreatin.[1]) Gefällt werden: Harnsäure, Purinkörper (mit Ausnahme von Alloxanthin), Kreatinin, Eiweiß, Ammoniak. Nicht gefällt werden, bleiben aber durch Erhitzen mit Phosphorwolframsäure auf 150° unzersetzt: Hippursäure, Aminosäuren.

Gegenwart von Zucker gibt zu niedrige Werte, da die aus dem Zucker gebildeten Huminsubstanzen Ammoniak festhalten. (Bereits 0·1% Zucker gibt nach *Mörner* bedeutenden Verlust an Harnstoffstickstoff. *Schöndorff* gibt ebenfalls an, daß das Erhitzen einer Harnstoffzuckerlösung mit Phosphorsäure einen Verlust von 4·3—9·3% Stickstoff bewirkt.) Man erhält richtige Werte, wenn man den diabetischen Harn auf ca. 1% Zucker bringt und beim Neutralisieren des Phosphorwolframsäure-Filtrates mit Kalkhydratpulver für einen Überschuß von Kalk Sorge trägt.

---

[1]) *G. Gumlich*, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **17**. S. 13 (1893). — *M. Pfaundler*, Über ein Verfahren zur Bestimmung des Amidosäurestickstoffs im Harne. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **30**. S. 74, 78 (1900). — *B. Schöndorff*, Eine Methode der Harnstoffbestimmung in tierischen Organen und Flüssigkeiten. *Pflügers* Archiv. Bd. **62**. S. 1 (1896). — Über Bestimmung der Karbaminsäure vgl.: *Macleod* and *Haskins*, The quant. estimation of carbamates. Americ. Journ. Phys. Vol. **12**. p. 449 (1905) und Contr. to our knowledge of the chem. of carbamates. Journ. Biol. Chem. Vol. **1**. p. 319 (1906).

## Kreatinin, $C_4H_7N_3O : C \begin{cases} NH - CO \\ NH \\ N(CH_3)CH_2 \end{cases}$

**Eigenschaften.** Kristallisiert aus heißgesättigter wässeriger Lösung wasserfrei in farblosen monoklinen Säulen, aus kaltgesättigter Lösung häufig in großen Tafeln und Prismen mit 2 Molekülen Kristallwasser. Löst sich in 11 Teilen Wasser von 15°, leichter in heißem Wasser, in 625 Teilen kaltem absolutem Alkohol, leichter in heißem Alkohol; in Äther ist es fast unlöslich. Ist eine starke Base. Mit Phosphorwolframsäure erhält man selbst bei sehr starker Verdünnung kristallinischen Niederschlag. Aus der wässerigen Lösung wird es ferner gefällt durch Silbernitrat, Sublimat, Merkurinitrat. Liefert mit Platinchlorid, Goldchlorid, Chlorzink charakteristische Doppelsalze. Wirkt reduzierend.

Kreatininchlorzink, $(C_4H_7N_3O)_2 ZnCl_2$, entsteht beim Versetzen der Kreatininlösung mit alkoholischer Chlorzinklösung. Pulverförmiger, mikrokristallinischer Niederschlag, aus feinen Nadeln bestehend, die konzentrisch gruppierte Rosetten bilden oder sich kreuzende Büschel. Löslich in 9217 Teilen Alkohol von 98% und in 5743 Teilen Alkohol von 87%. Man gewinnt daraus das Kreatinin wieder, indem man die Verbindung in wenig heißem Wasser löst, mit fein verteiltem Bleioxydhydrat wenigstens eine Viertelstunde kocht. Das mit Tierkohle entfärbte Filtrat hinterläßt beim Einengen ein Gemisch von Kreatinin mit wenig Kreatin. Das Kreatinin wird mit heißem absolutem Alkohol ausgezogen, das Kreatin bleibt ungelöst zurück.

Kreatininpikrat, $C_4H_7N_3O . C_6H_3N_3O_7$. Schmilzt bei 212—213°. Sehr wenig löslich in kaltem, besser in heißem Wasser.

Kreatinin-Kaliumpikrat, $C_4H_7ON_3 . C_6H_3O_7N_3 + C_6H_2N_3O_7K$. Wird aus Harn durch Zusatz einer alkoholischen Pikrinsäurelösung gefällt. Zitronengelbe Nadeln oder dünne Prismen. Sehr wenig löslich in kaltem, leicht löslich in heißem Wasser.

Salzsaures Kreatinin-Goldchlorid, $C_4H_7N_3O . HCl . AuCl_3$, ist in Wasser und Alkohol leicht löslich, in Äther unlöslich. Schmilzt bei 170—174°.

Zum Nachweis dient die charakteristische Chlorzinkverbindung, ferner folgende Reaktionen:

*Weyl*sche Reaktion.[1]) Man gibt zu der zu untersuchenden Flüssigkeit eine frisch bereitete, sehr verdünnte wässerige Nitroprussidnatriumlösung bis zur deutlichen Gelbfärbung hinzu und dann einige Tropfen verdünnte Natronlauge: die Flüssigkeit färbt sich tiefrot bis rubinrot, dann verblaßt die Farbe und wird strohgelb. Säuert man nun stark mit Eisessig an (etwa ein Viertel des Volumens) und erhitzt zum Sieden oder läßt man längere Zeit stehen, so färbt sich die Lösung grün und setzt bei längerem Stehen einen Niederschlag von Berlinerblau ab (*Salkowski*[2]).

*Jaffé*sche Reaktion.[3]) Zusatz von wässeriger Pikrinsäurelösung und einiger Tropfen Natronlauge zur Kreatininlösung oder zu Harn gibt intensive Rotfärbung. Bei Anstellung dieser wie auch bei der vorherigen Reaktion im Harn kocht man das eventuell vorhandene Aceton vorher am besten weg.

Bei Darstellung des Kreatinins verfährt man nach *Neubauer-Salkowski*[4]) folgendermaßen:

---

[1]) *Weyl*, Berichte. Bd. **11**. S. 2175 (1878); vgl. auch *V. Arnold*, Eine neue Nitroprussidnatriumreaktion des Harnes. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **49**. S. 397 (1906).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **4**. S. 133 (1880); Bd. **9**. S. 127 (1885).

[3]) *Jaffé*, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **10**. S. 399 (1886). Vgl. *A. Ch. Chapman*, Über die *Jaffé*sche Methode. Chem. News. Bd. **100**. S. 175 (1909).

[4]) *E. Salkowski*, Über die *Neubauer*sche Methode zur Bestimmung des Kreatinins im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **10**. S. 113 (1886). — Derselbe, Beiträge zur Chemie des Harns. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **14**. S. 471 (1890). — *Gregor*, Beiträge zur Physiologie des Kreatinins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **31**. S. 98 (1900/1). — *W. Czernecki*, Zur Kenntnis des Kreatins und Kreatinins im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **44**. S. 294 (1905).

240 $cm^3$ eiweiß- und zuckerfreier Harn werden mit Kalkmilch oder Ammoniak schwach alkalisch gemacht, mit Chlorcalcium genau ausgefällt, mit Wasser auf 300 $cm^3$ aufgefüllt, gut gemischt, nach 15 Minuten durch ein trockenes Filter filtriert und 250 $cm^3$ vom schwach alkalisch reagierenden Filtrat abgemessen. Das Filtrat muß schwach alkalisch reagieren; ist es zu stark alkalisch, so setzt man vorsichtig nach dem Abmessen verdünnte Salzsäure hinzu. Man dampft jedoch am besten, um eine Umwandlung von Kreatinin in Kreatin zu verhindern, bei schwach essigsaurer Reaktion ein. Das Filtrat wird anfangs auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbad bis auf 20 $cm^3$ eingedampft, mit zirka dem gleichen Volumen absolutem Alkohol durchgerührt, in einen etwas absoluten Alkohol enthaltenden Meßkolben von 100 $cm^3$ gebracht, mit Alkohol nachgespült, damit auf 100 $cm^3$ aufgefüllt, tüchtig durchgeschüttelt und stehen gelassen. Während des Erkaltens muß man den Kolben öfters gelinde anstoßen, um die im Niederschlag enthaltene Luft herauszubringen. Nach völligem Erkalten ergänzt man das Volumen wieder auf 100 $cm^3$, läßt bis zum nächsten Tag stehen, filtriert durch ein trockenes Filter und mißt vom Filtrat 80 $cm^3$ (gleich 160 $cm^3$ Harn) zur Bestimmung ab. Man fügt zu diesem Zwecke $^1/_2$—1 $cm^3$ alkoholische, säurefreie Chlorzinklösung (sirupdicke Chlorzinklösung in ziemlich starkem Alkohol gelöst, bis zur Dichte von 1·20 verdünnt und filtriert) hinzu. Nach 3—4tägigem Stehen scheiden sich Kristalldrusen von Kreatinchlorzink aus. Man sammelt das Doppelsalz auf einem getrockneten, gewogenen Filter, wäscht mit 90%igem Alkohol bis zum Verschwinden der Chlorreaktion, trocknet bei 100° und wägt. 1 Teil Kreatininchlorzink entspricht 0·6242 Teilen Kreatinin. Oder bequemer werden nach *Gregor* die Kreatininchlorzinkkristalle samt Filter in den Kjeldahlkolben gebracht und ihr Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt. 42 N = 113 Kreatinin.

Es ist vorteilhaft, den Harn vor der Fällung mit Kalkmilch und Chlorcalcium mit Natronlauge nahezu zu neutralisieren und die Menge Kalkmilch möglichst klein zu bemessen *(Czernecki, Gregor).* Das schwach alkalisch reagierende Filtrat wird unter Essigsäurezusatz eingedampft. Falls man stark (mineral-) saure Harnfiltrate eindampft, ist es notwendig, der Flüssigkeit vor dem Zusatz des Chlorzinks etwas essigsaures Natrium hinzuzufügen, wenn man kein Kreatin verlieren will.

Die Methode hat manche Fehlerquellen[1]); für den menschlichen Harn ist sie immerhin brauchbar, für Kaninchen- und Hundeharn hingegen unzuverlässig.[2])

Eine andere Darstellungsmethode des Kreatinins aus dem Harn rührt von *Folin*[3]) her. Das Verfahren beruht auf der Fällbarkeit des Kreatinins durch Pikrinsäure.

[1]) *C. J. C. van Hoogenhyze* und *H. Verploegh,* Beobachtungen über die Kreatininausscheidung beim Menschen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 415 (1905).

[2]) *M. Jaffé,* Untersuchungen über die Entstehung des Kreatins im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **48**. S. 430 (1906).

[3]) *O. Folin,* Beitrag zur Chemie des Kreatinins und Kreatins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41. S. 223, 235 (1904).

18 *g* Pikrinsäure für je 1 *l* Harn werden abgewogen und in kochendem Alkohol gelöst (100 *cm*³ Alkohol für je 40 *g* Pikrinsäure). Diese heiße Lösung wird unter kräftigem Umrühren in den Harn gegossen. Das Umrühren wird — ohne die Wände des Gefäßes zu berühren — ein paar Minuten fortgesetzt, bis die Ausfällung des Pikrates beginnt. Nach $^1/_2$—$^3/_4$ Stunde ist beinahe alles Kreatinin in dem schweren, sandigen Bodensatz (zu 75—90% Kaliumkreatininpikrat) enthalten. Die Flüssigkeit, die durch die ausfällende Harnsäure getrübt ist, wird möglichst vollständig abgehebert, der Bodensatz auf dem Saugfilter mit gesättigter Pikrinsäurelösung gründlich gewaschen. Viermaliges Umkristallisieren aus heißem Wasser gibt das Kaliumkreatininpikrat analysenrein. Aus dem (nicht notwendig umkristallisierten) Kreatininpikrat kann das Kreatinin direkt in folgender Weise erhalten werden: Das noch feuchte Präzipitat wird gewogen und mit ca. halb soviel Gewichtsteilen Kaliumbikarbonat und ca. 150 *cm*³ Wasser pro je 4 *l* des angewandten Harnes während einer halben Stunde in einer großen Reibschale verrieben. Durch diese Behandlung geht das Kreatinin quantitativ in Lösung und die entsprechende Pikrinsäure wird in das schwer lösliche Kaliumsalz übergeführt; letzteres wird auf dem Saugfilter abfiltriert und mit kleinen Mengen Kaliumbikarbonatlösung gewaschen. Das Filtrat wird vorsichtig mit 20%iger Schwefelsäure neutralisiert, die schwach saure Lösung mit zwei Volumina Methyl- oder Äthylalkohol vermischt und sogleich, ohne zu filtrieren, mit kleinen Mengen Tierkohle entfärbt. Nach wenigen Minuten wird filtriert, um die Tierkohle und das gesamte, durch Alkohol ausgefällte Kaliumsulfat zu entfernen. Das schwach gelb gefärbte Filtrat wird am besten einige Stunden oder bis zum nächsten Tage stehen gelassen und nochmals filtriert (kleine Mengen Kreatinin werden von der Tierkohle zurückgehalten). — Der Kreatininlösung wird nun konzentrierte Zinkchloridlösung allmählich zugesetzt, so lange noch eine weitere Fällung entsteht, und das Ganze bis zum nächsten Tage stehen gelassen. Das entstandene Doppelsalz wird abfiltriert, einige Male mit 50%igem Alkohol gewaschen. Aus dem Kreatininchlorzink wird das Kreatinin durch Behandlung mit Bleihydrat von Zink und Chlor befreit. Nach dem Kochen mit Bleihydrat, das im Überschuß vorhanden sein muß, empfiehlt es sich, Schwefelwasserstoff einige Minuten, d. h. bis die gesamte Fällung fast vollständig schwarz ist, durchzuleiten. Durch diesen Kunstgriff erhält man eine sehr leicht filtrierbare Mischung. Das klare Filtrat wird nun durch $H_2S$ vollständig entbleit. Die auf diese Weise erhaltene wasserklare Lösung enthält ein Gemenge von Kreatinin und Kreatin. Die Menge des Kreatinins wird nach dem kolorimetrischen Verfahren (siehe unten) bestimmt, und zwar zunächst orientierend in ca. 0·1 *cm*³ Lösung, dann wird 1 *cm*³ der Lösung bis zu etwa ein Milligramm Kreatinin pro Kubikzentimeter verdünnt und in so verdünnter Lösung die genaue Bestimmung gemacht. Um das Kreatin, das neben Kreatinin vorhanden ist, zu bestimmen, nimmt man 5—10 *cm*³ der verdünnten Lösung und erhitzt auf dem Wasserbade mit 5 *cm*³ normaler Salzsäure während 3 Stunden. Aus der

so gewonnenen Menge an Gesamtkreatinin ist die Menge des Kreatins leicht zu berechnen.

Oder man fügt zur Umwandlung des Kreatins in Kreatinin eine bestimmte Menge Normalschwefelsäure zur Lösung und kocht ein, bis das Volumen der Flüssigkeit etwa der Menge zugesetzter Normalsäure entspricht, und erhitzt darauf 36—48 Stunden lang auf dem Wasserbade. Eine der $H_2SO_4$ genau entsprechende Bariumhydratlösung wird dann in das Kreatinin-$H_2SO_4$-Gemisch eingegossen. Nach einer halben Stunde wird das Bariumsulfat abfiltriert und das Filtrat und Waschwasser rasch über der freien Flamme durch Kochen konzentriert, bis in der noch kochenden Flüssigkeit ein Teil des gelösten Kreatinins schon ausgefallen ist. Nach dem Erkalten ist die ganze Flüssigkeit gewöhnlich erstarrt. Die Mutterlauge wird auf dem Saugfilter abgesaugt und das Kreatinin mit kleinen Mengen Alkohol zwei- oder dreimal gewaschen. Durch zweimaliges Umkristallisieren ist das in dieser Weise erhaltene Kreatinin analysenrein.

Es sei hier auch die von *Jaffé*[1]) angewandte Darstellungsweise angeführt:

Der 24stündige Harn wird auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft und mit heißem Alkohol erschöpfend extrahiert: alles Kreatinin, wie auch dem Harn zugesetztes Kreatin, geht vollständig in den alkoholischen Auszug. Die Alkoholauszüge werden vereinigt, nach dem Verdunsten des Alkohols in 150 *cm*³ Wasser gelöst und nach Zusatz von 25 *cm*³ offizineller reiner Salzsäure 4 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Durch Abdampfen auf dem Wasserbade und wiederholte Erneuerung des verdampften Wassers wird die freie Salzsäure entfernt, der Rückstand in Wasser gelöst, mit etwas Tierkohle entfärbt, letztere gründlich mit siedendem Wasser ausgewaschen, dann Filtrat und Waschwasser unter Zusatz von etwas essigsaurem Natrium verdunstet. Der sirupöse Rückstand mit 60—100 *cm*³ siedendem Alkohol extrahiert. Die Hälfte der so gewonnenen, nach völligem Klären filtrierten Lösung dient zur Bestimmung des Kreatinins, das nach Zusatz von Zinkchlorid gefällt wird. Es ist jedoch vorteilhaft, der Chlorzinkfällung eine Behandlung des alkoholischen Auszuges mit Pikrinsäure vorauszuschicken. Die Lösung wird mit dem gleichen Volumen gesättigter alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt, nach 24stündigem Stehen der Niederschlag abfiltriert, mit alkoholischer Pikrinsäure, dann mit reinem Alkohol, dann Äther gewaschen und an der Luft getrocknet. Das Pikrat wird durch Erhitzen mit Salzsäure zersetzt, die durch Ausschütteln mit Äther von der Pikrinsäure befreite Lösung nach Zusatz von etwas Natriumacetat verdunstet und mit 30—50 *cm*³ heißem Alkohol extrahiert. Das völlig geklärte Filtrat gibt auf Zusatz von 15—20 Tropfen alkoholischer Chlorzinklösung und kräftigem Umrühren sofort eine fast farblose, kristallisierte Ausscheidung von Kreatininchlorzink, die in wenigen Stunden beendigt ist. Nach diesem Verfahren werden annähernd 70°/₀ des zugesetzten Kreatins wiedergefunden.

[1]) *M. Jaffé*, Unters. über die Entstehung des Kreatins im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48. S. 430 (1906).

Bei Umwandlung des Kreatins in Kreatinin gab für reines Kreatin die besten Resultate mehrstündiges Erhitzen im Wasserbade mit 2—2·5%iger Salzsäure.

Andere Darstellungsmethoden sind bereits früher von *Maly* und von *Hofmeister* angegeben worden.[1])

Die quantitative Bestimmung des Kreatinins wird am besten nach *Folin* ausgeführt. Diese ist eine kolorimetrische und beruht auf der Rotfärbung des Kreatinins mit alkalischer Pikrinsäurelösung; die Farbenintensität dieser Färbung wird in bestimmter Schichtlänge mit einer Standardlösung verglichen.

Eine Lösung von 10 *mg* Kreatinin in 10 $cm^3$ Wasser gibt nach Zusatz von 15 $cm^3$ 1·2%iger Pikrinsäurelösung und 4—9 $cm^3$ 10%iger Natronlauge nach 5—10 Minuten die maximale Rotfärbung. Die in dieser Weise erhaltene Lösung gibt auf 500 $cm^3$ Wasser verdünnt eine Flüssigkeit, von der 8·1 *mm* im durchfallenden Lichte genau dieselbe Farbe hat wie 8 *mm* von einer ½ n-Kaliumbichromatlösung. Die Färbung der Kreatininlösung ist während der ersten [10] Minuten unverändert; nach ½ Stunde ist sie jedoch abgeschwächt. Mäßige Veränderungen in der Verdünnung sind ohne Bedeutung.

Reagenzien und Apparate:

1. Ein zwei Röhrchen enthaltender Kolorimeter, in welchen die Höhe der angewandten Flüssigkeiten bis auf $^1/_{10}$ *mm* eingestellt werden kann.
2. Eine ½ n-Kaliumbichromatlösung (25·54 *g* pro Liter).
3. Eine annähernd gesättigte (½%ige) Pikrinsäurelösung.
4. 10%ige Natronlauge.

Bei der Ausführung der Bestimmung wird in eine Röhre des Kolorimeters die ½ n-Kaliumbichromatlösung gefüllt und genau auf 8 *mm* eingestellt. Es empfiehlt sich, zunächst auch in die zweite Röhre die ½ n-Kaliumbichromatlösung zu gießen und die beiden Röhren auf Gleichheit einzustellen. Das Mittel von 3—4 Beobachtungen darf nicht mehr als 0·1 *mm* vom richtigen Wert (8 *mm*) abweichen, und die Differenz von je zwei Beobachtungen soll 0·3 *mm* nicht überschreiten, was nach einiger Übung leicht zu erreichen ist. Nun werden 10 $cm^3$ Harn in einem 500 $cm^3$ fassenden Meßkolben mit 15 $cm^3$ Pikrinsäurelösung und 5 $cm^3$ Natronlauge versetzt, die Flüssigkeit ein paarmal umgeschüttelt und 5 Minuten ruhig stehen gelassen. Nach Verlauf dieser Zeit wird der Meßkolben bis zur 500 *cm*-Marke mit Wasser aufgefüllt und der Inhalt gut gemischt. Sogleich wird jetzt das zweite Rohr des Kolorimeters mit dieser Lösung ausgespült und der kolorimetrische Wert der Lösung mit dem der Testlösung im anderen Rohr bestimmt. Die Mengen Kreatinin sind aus dem kolorimetrischen Wert leicht zu berechnen. Angenommen, die kolorimetrischen Werte ergeben bei drei Bestimmungen 7·3 *mm*, 7·1 *mm* und 7·2 *mm*, im Mittel 7·2 *mm*, so ist, da

---

[1]) *Maly*, Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. **159**. S. 279 (1871). — *Fr. Hofmeister*, Über die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen des Harns. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **5**. S. 67 (1881).

8·1 *mm* 10 *mg* Kreatinin entspricht, der Kreatiningehalt in 10 *cm*³ Harn demnach $\frac{8·1}{7·2}$ . 10 = 11·25 *mg*.

Die zur Anwendung kommenden Mengen Harn sollen 7—15 *mg* Kreatinin für 500 *cm*³ Flüssigkeit enthalten. Je stärker konzentriert die Untersuchungslösung ist, um so schärfer läßt sie sich mit der Chromatlösung vergleichen, um so geringer werden die Differenzen der Ablesung. Am geeignetsten sind Lösungen, die bei 4·5—11 *mm* Dicke 8 *mm* Chromatlösung entsprechen.[1]) Geben die kolorimetrischen Beobachtungen Werte unter 5 *mm*, dann wird die Bestimmung wiederholt mit nur 5 *cm*³ Harn, oder 25 *cm*³ Harn werden zuerst mit 25 *cm*³ Wasser verdünnt und die Bestimmung wird mit 10 *cm*³ verdünnten Harnes ausgeführt, oder die Bestimmung wird mit 10 *cm*³ des nicht verdünnten Harnes unter Anwendung von einem 1000 *cm*³ fassenden Meßkolben wiederholt. Gibt die kolorimetrische Bestimmung über 13 *mm* liegende Werte, so wird die Bestimmung an 20 *cm*³ Harn vorgenommen.

Aceton, Acetessigsäure, Schwefelwasserstoff können die Reaktion stören, diese müssen daher, am besten durch Kochen des Harnes, entfernt werden. Die Störung durch die schnell verblassende Färbung des Acetons ist übrigens kaum nennenswert. Traubenzucker, Harnsäure geben die Reaktion nicht; organische wie unorganische Salze sind ebenfalls unschädlich. Hingegen hat die Temperatur einen zu beachtenden Einfluß auf die Reaktion: Die Lösung nimmt durch Temperaturzunahme eine dunklere Farbe an. *Van Hoogenhyze* und *Verploegh* benutzen daher zum Verdünnen der Lösung Wasser von 15⁰. Auch *Mellanby* weist auf die Wichtigkeit des Temperatureinflusses hin. Die Lösungen, Kreatininlösung, Pikrinsäurelösung, Natronlauge, sollen die gleiche Temperatur haben; eine Differenz von 2—3⁰ stört das Resultat bereits.

Was die Zeit der Ablesung anlangt, so ist im kolorimetrischen Wert kein Unterschied zu beobachten, wenn das Reaktionsgemisch auch einige

[1]) Zur *Folin*schen Methode vgl. folgende Arbeiten: *S. Weber*, Physiologisches zur Kreatininfrage. Arch. f. exper. Pharm. u. Path. Bd. **58**. S. 93 (1908). — *van Hoogenhyze* und *H. Verploegh*, Beobachtungen über die Kreatininausscheidung beim Menschen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 415 (1905). — Derselbe, Weitere Beobachtungen über die Kreatininausscheidung beim Menschen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **57**. S. 161 (1908). — *Ed. Mellanby*, Creatin and Creatinin. Journ. of Physiol. Vol. **36**. p. 447 (1907/8). — *A. Rothmann*, Über das Verhalten des Kreatins bei der Autolyse. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57. S. 140 (1908). — *R. Gottlieb* und *R. Stangassinger*, Über das Verhalten des Kreatins bei der Autolyse. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **52**. S. 1 (1907). — *D. Nöel Paton*, On *Folins* Theorie of proteid metabolism. Journ. of Physiol. Vol. **33**. p. 1 (1905/6). — *G. Lefmann*, Beiträge zum Kreatininstoffwechsel. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **57**. S. 476, 478 (1908). — *G. Dorner*, Zur Bildung von Kreatin und Kreatinin im Organismus, besonders der Kaninchen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **52**. S. 225, 228 (1907). — *G. Benedict* und *V. C. Myers*, The elimination of creatinine in women. Amer. Journ. of Phys. Vol. **18**. p. 397 (1907). — *Stangassinger*, Über das Verhalten des Kreatins bei der Autolyse. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **55**. S. 295, 297 (1908). — *Bauer* und *Barschall*, Arb. aus d. kais. Gesundheitsamte. Bd. **24** (1906).

Zeit gestanden hat; innerhalb einer halben Stunde kann nach *Mellanby* die Ablesung noch gut gemacht werden. Mit der Zeit blaßt jedoch die Farbe ab.

Es sind verschiedene Kolorimeter in Anwendung gekommen.[1])

Das häufig benutzte Kolorimeter von *Dubosq* besteht aus zwei zylindrischen Gefäßen, deren untere Fläche von unten her von einem Spiegel gleichmäßig beleuchtet wird und in welchen zwei zylindrische, durch planparallele Glasplatten geschlossene Röhren durch Schrauben verschiebbar sind, so daß man die Höhe der zu durchstrahlenden Schicht verändern kann. Aus dem Verhältnis der eingestellten Höhe der Tauchzylinder, bei

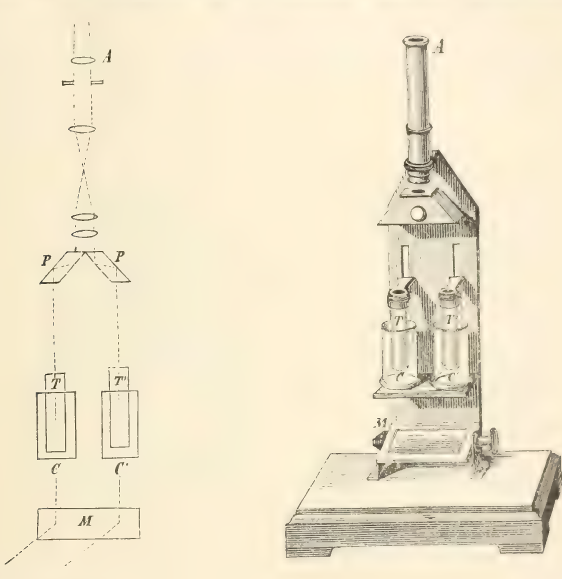


Fig. 266. Fig. 267.

welchen gerade gleich große Farbenintensität herrscht, ermittelt man die Konzentration der zu untersuchenden Lösung (Fig. 266 und 267).

Ein billigeres Kolorimeter ohne Prismenverwendung benutzten *Gottlieb* und *Stangassinger* bei ihren Untersuchungen. Das Prinzip des Apparates ist im folgenden skizziert (Fig. 268 und 269).

Die von den Spiegeln $S$, $S_1$ reflektierten Lichtstrahlen passieren die gefärbten Flüssigkeitssäulen $F$, $F_1$; sie treffen dann hälftiglich auf die geschwärzte Rückseite der Spiegel $C$, $C_1$, wo sie absorbiert werden, hälftiglich

[1]) Über Kolorimetrie vgl. das empfehlenswerte Werk: *G.* und *H. Krüss*, Kolorimetrie und quantitative Spektralanalyse. 2. Aufl., Hamburg und Leipzig 1909.

aber auf die Spiegel $B$, $B_1$. Von $B$, $B_1$ werden die Strahlen nach $C$, $C_1$ reflektiert: nach abermaliger Zurückwerfung gelangen dieselben dann parallel nach $A$ in das beobachtende Auge. Getrennt sind die Farbenteilfelder durch einen schmalen, schwarzen Strich, der durch Zusammenstoß der Spiegel $C$, $C_1$ entsteht.

Das Kolorimeter stammt aus der Werkstatt von H. Runne in Heidelberg. In nachstehender Fig. 269 ist es $^2/_5$ der natürlichen Größe dargestellt.

Von der Fußplatte $U$ gehen vier Pfeiler $D$, $D_1$, $D_2$, $D_3$ in die Höhe, die durch Schrauben mit der oberen, den schwarzen Kasten tragenden Platte $O$ verbunden ist. Die Säulen $D$, $D_1$ sind mit Schraubengewinden von 1 *mm* Ganghöhe ausgestattet, auf denen die Schraubenmuttern $E$, $E_1$ auf- und abbewegt werden können. Der Umfang von $E$, $E_1$ ist in 10 Teile geteilt, mit Marken versehen und gestattet $^1/_{10}$ *mm* Ablesung. Durch Drehung

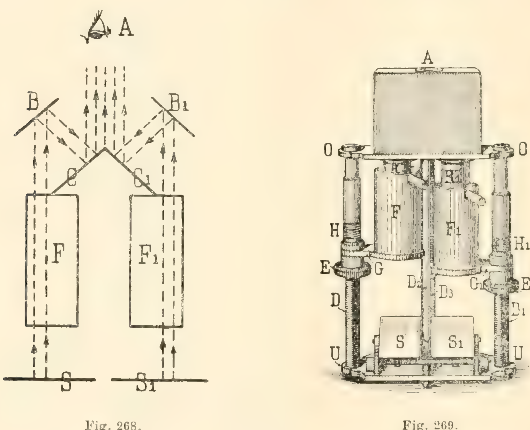



Fig. 268. Fig. 269.

der Schrauben $E$, $E_1$ wird das starre Trägergleitstück $G$, $G_1$ — bestehend aus Gleitrohr und Trägerplatte mit Ausschnitt — bewegt und die Höhenänderung in dem Ausschnitt $H$, $H_1$ dieses Gleitrohres auf $E$, $E_1$ an der Millimeterskala abgelesen. Das Gleitstück trägt abnehmbar den zur Aufnahme der Flüssigkeiten bestimmten und mit Ausguß versehenen Zylinder $F$, $F_1$, dessen Boden durch eine planparallele Glasplatte gebildet wird. In diesen beweglichen Zylinder ragt eine engere, mit $O$ starr verbundene Röhre $R$, $R_1$ hinein, die unten durch planparalleles Glas verschlossen ist. Liegen nun die beiden parallelen Glasplatten aufeinander, so erscheint der Kreis rein weiß und die Millimeterteilung auf $D$, $D_1$ und $E$, $E_1$ zeigt Null. Zur sicheren Führung gleitet die Trägerplatte noch in einer Nute auf $D_2$; $D_3$ (in der Figur nicht deutlich sichtlich) vervollkommnet die Stabilität des Apparates. Der schwarze, auf $O$ geschraubte Kasten birgt in seinem

Innern die aus Fig. 268 ersichtlichen Spiegel *B*, $B_1$ und *C*, $C_1$. Das Sehloch *A* ist durch eine schwach gekrümmte Linse verschlossen. Zur Beleuchtung der Spiegel *S*, $S_1$ wurde weißes diffuses Licht benutzt.

Die Handhabung des Apparates ist sehr einfach. In den einen Zylinder *C* bringt man die gewählte Standardlösung und stellt mit Hilfe der Schraube *E* die gewählte Höhe der Flüssigkeitssäule zwischen den parallelen Platten der Zylinder *C* und *R* genau ein; in den anderen Zylinder $C_1$ wird die gefärbte Untersuchungsflüssigkeit gegeben und durch Heben oder Senken desselben die zwischen $C_1$ und $R_1$ befindliche Flüssigkeitssäule bis zum Eintritt der Farbengleichheit der Teilfelder variiert. Die Höhe dieser dazu erforderlichen Flüssigkeitssäule wird dann abgelesen.

Eine empfehlenswerte Anordnung geben ferner *van Hoogenhyze* und *Verploegh* an. Auch das *Plesch*sche Chromophotometer, das von *Schmidt* und *Haensch* in vorzüglichster Ausführung geliefert wird, eignet sich zu der kolorimetrischen Bestimmung sehr gut.

Um das Kreatin neben dem Kreatinin nachzuweisen, wird zuerst der Gehalt an präformiertem Kreatinin festgestellt und in einer anderen Probe das Kreatin in Kreatinin übergeführt. *Folin* erhitzt zu diesem Zwecke 10 $cm^3$ Harn mit 5 $cm^3$ Normalsalzsäure auf dem Wasserbade 3 Stunden lang. Dadurch wird der Harn deutlich braun gefärbt, doch soll dies nach dem Verdünnen auf 500 $cm^3$ die Bestimmung nicht stören. Über die zur Umwandlung am besten anzuwendende Säurekonzentration, wie auch über die Dauer der Erwärmung differieren die Angaben jedoch bei den verschiedenen Autoren, da in physiologischen Flüssigkeiten die Bedingungen andere als bei reinen Lösungen und auch nicht konstante sind. *Jaffé* erhitzt die Lösung mit 2—2·5% Salzsäuregehalt 3—4 Stunden lang auf dem siedenden Wasserbade. *Gottlieb* und *Stangassinger* fanden, daß eine reine Kreatinlösung nach zweistündiger Erhitzung auf dem kochenden Wasserbade mit 4·56%iger Salzsäure oder 4·32%iger Schwefelsäure nach $2^1/_2$ Stunden quantitativ in Kreatinin umgewandelt wurde. Beim enteiweißten Fleischextrakt wie im Harn war hingegen die 2·2%ige Salzsäurekonzentration und dreistündige Erhitzung das Geeignetste, wie auch nach den Erfahrungen von *A. Rothmann* im Blut und in den Filtraten von den Eiweißkoagulis der Autolysenversuche. *Benedict* und *Myers* erhitzen den Harn mit der doppelten Menge Normalsalzsäure im Autoklaven $^1/_2$ Stunde auf 117°.[1])

Zur Darstellung des Gesamtkreatinins (Kreatin + Kreatinin) aus den Muskeln wird nach *Weber*[2]) das fein zermahlene Fleisch mit viel 1%iger Salzsäure aufgekocht und ca. 12 Stunden auf dem siedenden Wasserbade stehen gelassen. Die Lösung erfolgt zum größten Teil. Nach Abkühlung wird die stark verdünnte Lösung unter Zusatz von wenig Zinksulfat vorsichtig neutralisiert, so von der Hauptmenge von Eiweiß befreit. Die Filterrückstände

[1]) *F. C. Cook,* Factors which influence the creatinine determination. J. Amer. chem. Soc. T. 31. p. 673 (1909).

[2]) l. c.

werden nochmals wie oben mit Salzsäure behandelt. Die vereinigten Filtrate werden bei schwach essigsaurer Reaktion auf ein bestimmtes Volumen bei möglichst niedriger Temperatur eingedampft. Ein aliquoter Teil wird auf 4·56⁰/₀ige Salzsäure gebracht, 3 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt und kolorimetrisch bestimmt.

*Mellanby*[1]) verfährt bei der Bestimmung des Kreatinins folgenderweise: Der verriebene Muskel wird mit Alkohol und mit Wasser gründlich extrahiert und die vereinigten Extrakte zur Trockene verdampft und der Rückstand mit Alkohol ausgezogen. Dadurch geht das Kreatinin in Lösung, während Eiweißkörper und die meisten Salze zurückbleiben. Der alkoholische Extrakt wird nach dem Verdunsten auf 150 *cm*³ ergänzt, filtriert, ein aliquoter Teil (100 *cm*³) auf dem Wasserbad verdampft, mit Wasser auf 50 aufgefüllt und in der Flüssigkeit die Bestimmung nach *Folin* gemacht. Bei Umwandlung des Kreatins in Kreatinin ist es nötig, die zur Umwandlung nötige Säure vor der kolorimetrischen Bestimmung genau zu neutralisieren. Nach *Mellanby* ist es auch besonders beachtenswert, daß die nach dem Erhitzen auf dem Wasserbade zur Verwendung kommende Flüssigkeitsmenge nicht etwa durch Auswaschen vergrößert werden dürfe. *Lefmann*[2]) ging so vor, daß er die *Jaffé*sche Reaktion mit Pikrinsäure in dem gleichen Gefäß vornahm, in dem der Urin zwecks Überführung von Kreatin in Kreatinin mit Salzsäure erhitzt und neutralisiert worden war; danach setzte er so viel Wasser zu, als dem Volumen der ursprünglichen Urinmenge (gewöhnlich 20 *cm*³) entsprach. Nach dem Eintreten der Reaktion wurde die gesamte Flüssigkeitsmenge in einen Meßkolben von 500 *cm*³ Inhalt gespült und zur kolorimetrischen Untersuchung verwendet.

Zur Bestimmung des Kreatins und Kreatinins in Autolysenversuchen geben *Gottlieb* und *Stangassinger*[3]) das folgende Verfahren an: Die eiweißhaltigen Lösungen werden in 150 *cm*³ bzw. 300 *cm*³ 5⁰/₀ige siedende ClNa-Lösung eingegossen, bei schwach essigsaurer Reaktion rasch aufgekocht. Das auskoagulierte Eiweiß wird abfiltriert, mit siedendem Wasser gut nachgewaschen, das Filtrat davon wird in einem Maßkolben auf bestimmtes Volumen gebracht und in zwei Teile geteilt. In einer Filtrathälfte wird das vorhandene Kreatinin bestimmt. Dieselbe wird auf dem Wasserbade unter Zusatz von Bariumkarbonat zur Neutralisierung der zugesetzten verdünnten Essigsäure rasch zur Trockene gebracht. In der zweiten Hälfte des Eiweißfiltrates wird die Kreatin- plus Kreatininbestimmung ausgeführt. Diese zweite Filtrathälfte wird ohne Bariumkarbonat eingeengt und auf 100 *cm*³ mit dem Gehalte von 2·2⁰/₀ HCl gebracht. Die salzsaure Lösung wird nun zur Umsetzung des vorhandenen Kreatins drei Stunden auf einem lebhaft siedenden Wasserbade erwärmt; nach dieser Zeit wird

[1]) l. c.

[2]) *Lefmann*, Beiträge zum Kreatininstoffwechsel. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **57**. S. 479 (1908).

[3]) *Gottlieb* und *Stangassinger*, Über das Verhalten des Kreatins bei der Autolyse. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **52**. S. 12 (1907).

der Erlenmeyerkolbeninhalt in einer Schale, ohne die Lösung vorher zu neutralisieren, zur Trockene verdunstet. Der so erhaltene Trockenrückstand wird in wenig Wasser gelöst, bei Zimmertemperatur mit der erforderlichen Menge natronalkalischer Pikrinsäurelösung versetzt, nach 5 Minuten dauernder Einwirkung derselben in einen Meßkolben gespült, auf das erforderliche Volumen verdünnt, von den ausgeschiedenen kohligen Zersetzungsprodukten abfiltriert und die klare Lösung auf den Gesamtgehalt untersucht. Diese Autoren fanden in Übereinstimmung mit *Jaffé*[1], daß die komplexe Zusammensetzung der Flüssigkeiten wie des Harnes, welche der siedenden Salzsäure zahlreiche Angriffspunkte liefert, das Kreatin vor der zerstörenden Einwirkung derselben schützt. — Weiterhin sind folgende Beobachtungen zu erwähnen.[2] Eindampfen der Eiweißfiltrate, namentlich der Leberfiltrate, soll zur Vermeidung roter Farbenrückstände, die die kolorimetrische Bestimmung stören könnten, auf stark siedendem Wasserbade vorsichtig ausgeführt werden. Die Operation des Eindampfens darf zur Vermeidung von Kreatininverlusten nur bis zum eben beginnenden Trockenwerden des Schaleninhaltes ausgedehnt werden. Vor Anstellung der *Jaffé*schen Reaktion wird der in Wasser aufgenommene Rückstand neutralisiert. Feinste Kohlepartikelchen, die trotz Filtrierens in der Lösung bleiben, scheinen auf die kolorimetrische Bestimmung keinen Einfluß auszuüben. Bei der rötlichen Eigenfarbe der eingeengten Lösungen (namentlich bei Leberextrakten) ermittelten Verfasser in einer Probe den durch die Nuance vorgetäuschten Kreatiningehalt und brachten diesen Wert nach Anstellung der *Jaffé*schen Reaktion von der in einer zweiten Probe ermittelten Kreatininzahl in Abzug. Sind jedoch bei großen Kreatininmengen auch große Verdünnungen von etwa 1—4 *l* möglich, so braucht die Eigenfarbe wohl kaum mehr berücksichtigt zu werden. Bei der Umsetzung des Kreatins in Kreatinin soll man die Wirkung der Salzsäure nur durch Vergrößerung des Volumens 2·2%iger HCl, nicht aber durch Erhöhung der Konzentration steigern. Im Gegensatz zu *Weber* meinen Verfasser, daß die Umsetzung des Kreatins in Kreatinin bei richtiger Handhabung der Methode mit genügender Genauigkeit erfolgt und daß die Werte für das Gesamtkreatinin sogar insofern mehr Vertrauen verdienen als die kolorimetrische Bestimmung des präformierten Kreatinins, da durch die Salzsäurebehandlung verschiedene Stoffe aus der Reaktionslösung entfernt werden, die neben dem Kreatinin reduzierend auf alkalische Pikrinsäure einwirken können.

Vorzüglich geeignet zur Enteiweißung und Entfärbung physiologischer Flüssigkeiten (z. B. von Blut) bei der nachträglichen Kreatininbestimmung ist das „Eisenverfahren" von *Michaelis* und *Rona* (vgl. Bd. I, S. 696), wobei das Kreatinin im farblosen, neutralen Filtrat quantitativ wiedergefunden wird.[3]

---

[1]) *Jaffé*, Unters. etc. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 48. S. 436 (1906).

[2]) *Stangassinger*, Über das Verhalten des Kreatinins bei der Autolyse. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 55. S. 297 (1908).

[3]) Noch nicht veröffentlichte Versuche von *P. Rona*.

Bezüglich der Bestimmung von Kreatin und Kreatinin in Fleisch vgl. u. a. *A. D. Emmett* und *H. S. Grindley*.[1])

## Schwefel.

### Gesamtschwefel.

Die Bestimmung des Gesamtschwefels im Harn erfolgt nach der Vorschrift von *Salkowski*[2]) wie folgt:

25 *cm*³ (bei konzentriertem Harn 25 *cm*³ des mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnten Harnes) werden auf dem Wasserbad in einer Platinschale auf ein kleines Volumen eingedampft, dazu 20 *g* Salpetermischung (3 Gewichtsteile Kalisalpeter, 1 Gewichtsteil Natriumkarbonat) vorsichtig von der Seite her mit einer Spiritusflamme bis zum völligen Schmelzen und Weißwerden der Schmelze erhitzt, die Schmelze in Wasser gelöst, in einen Kolben gegossen, nachgespült, in den Kolben vorsichtig und allmählich durch einen Trichter 100 *cm*³ Salzsäure eingegossen, auf dem Sandbad bei aufgesetztem Trichter erhitzt, bis die Gasentwicklung ganz aufgehört hat; man überträgt die Flüssigkeit in eine Porzellanschale und dampft mit Salzsäure bis zur Trockene ein. Dieses Eindampfen des Rückstandes mit Salzsäure wiederholt man noch einige Male, um alle Salpetersäure zu entfernen und nimmt schließlich den Rückstand mit Wasser auf. Man filtriert von der Kieselsäure ab in ein Becherglas, wäscht das Filter gut aus, erhitzt auf dem Drahtnetz bis zum beginnenden Sieden, setzt vorsichtig 10 *cm*³ heiße Chlorbariumlösung hinzu und verfährt wie weiter unten beschrieben bei der Bestimmung des Bariumsulfates.

Nach *Modrakowski*[3]) ist die Schmelze vorteilhaft aus 1 Teil Salpeter auf ca. 2 Teile Soda zu bereiten. Bei 50 *cm*³ Urin geben 6—7 *g* Soda und 3—4 *g* Salpeter immer eine schöne Schmelze. Die Zugabe erfolgt zwecks besserer Mischung zu dem uneingedampften Harn. Es ist nur notwendig, den Abdampfrückstand durch mehrstündiges Trocknen bei 110° wasserfrei zu machen.

[1]) *A. D. Emmett* and *H. S. Grindley*, Chemistry of flesh. VI. Further studies on the application of *Folins* Creatin and Creatinin-Method to meats and meat-extracts. — *Grindley* and *Woods*, Journ. of Biol. Chem. Vol. **2**. p. 309; Chem. Zentralbl. Jg. **1907**. I. S. 911; Journ. of Biol. Chem. Vol. **3**. p. 491 (1907); vgl. Journ. Amer. Chem. Soc. Vol. **27**. p. 658 (1905). Ferner vgl. dieses Werk. Bd. **2**. S. 1060.

[2]) *Salkowski*, Practicum. S. 272; auch Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. **10**. S. 346 (1886); vgl. auch *Rothera*, Journ. of Physiology. Bd. **32**. S. 175 (1905), der zur Schmelze folgende Mischung: 2 Teile $K_2CO_3$, 2 Teile $Na_2CO_3$ und 1 Teil $KNO_3$ empfiehlt.

[3]) *G. Modrakowski*, Über die Schwefelbestimmung im Harn mittelst Natriumperoxyd. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **38**. S. 562 (1903). Vgl. *Asboth*, Neue Methode zur Bestimmung des Schwefels in organischen Verbindungen. Chemikerzeitung. Bd. **19**. S. 2040 (1895). — *Fr. Düring*, Über die Schwefelbestimmung in verschiedenartigen animalischen Substanzen und in Haaren von Tieren verschiedenen Alters. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **22**. S. 281 (1896).

Besser ist es, die Oxydation **mit Natriumsuperoxyd zu bewirken.** Die Oxydation mit Natriumsuperoxyd erfolgt nach *Neumann* und *Meinertz*[1] folgendermaßen:

1 *g* Substanz (z. B. Casein) wird mit 5 *g* Kaliumnatriumkarbonat und 2·5 *g* Natriumsuperoxyd in einem Nickeltiegel von etwa 100 *cm*³ Inhalt innig vermengt und über einer kleinen Gasflamme ca. 1 Stunde erhitzt, bis die Mischung völlig zusammengesintert ist. Nach kurzer Abkühlung, ca. nach 5 Minuten, werden wieder 2¹/₂ *g* Peroxyd zugesetzt, dann wird mit kleiner Flamme noch einmal ca. 1 Stunde erwärmt, und zwar bis die Hauptmenge sich verflüssigt hat. Hierauf entfernt man den Gasbrenner, gibt noch 2 *g* Peroxyd hinein und glüht ca. ¹/₄ Stunde, indem man die Flamme stark nimmt. Der Tiegel bleibt dauernd bedeckt. — Die erkaltete Schmelze hat infolge geringer Mengen beigemengten Nickeloxyds eine grünlichgraue Farbe. Sie wird im Tiegel mit Wasser übergossen und (wegen der Gasentwicklung) bedeckt mit kleiner Flamme bis zur Lösung erhitzt. Die Flüssigkeit wird in ein Becherglas überspült, mit bromhaltiger Salzsäure vorsichtig (Bedecken mit einem Uhrglas!) sauer gemacht und nun auf dem Wasserbade einige Zeit erhitzt, wobei eine klare, grünliche Lösung entsteht. Die Flüssigkeit wird mit Bariumchlorid gefällt, das $BaSO_4$ nach dem Glühen gewogen.

Bei leicht verbrennlichen Substanzen muß man besonders anfangs wenig (ca. 1 *g*) Peroxyd nehmen.

Das Verfahren läßt sich für den Harn anwenden, indem man vorher 25—50 *cm*³ Harn im Nickeltiegel bis zum Sirup eindampft. *Modrakowski*[2] verfährt so:

In eine Nickelschale (nicht Porzellanschale) gibt man zunächst 1—2 *g* $Na_2O_2$ und läßt 50 *cm*³ Harn langsam zufließen. Nun dampft man die Flüssigkeit auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz ein und setzt vorsichtig weitere 2—3 *g* $Na_2O_2$ in kleinen Mengen unter Umrühren zu. Wenn die Reaktion ruhiger wird, entfernt man die Schale vom Wasserbade und erwärmt mit Spiritusbrenner, bis die Entwicklung von Wasserdampf aufhört. Dann erhitzt man über einer starken Spiritusflamme, nötigenfalls unter nochmaligem Zusatz von 1—3 *g* $Na_2O_2$. Die Masse bildet jetzt braune Tropfen und ist schließlich dickflüssig; damit ist die Reaktion beendet. Nach dem Erkalten löst man die Schmelze in heißem Wasser, filtriert (das Filtrat muß wasserklar sein) und säuert schwach mit Salzsäure an. Dann folgt die Fällung mit Chlorbarium.

---

[1]) *Neumann* und *Meinertz*, Zur Schwefelbestimmung mittelst Natriumperoxyd. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **43**. S. 37 (1904/5).

[2]) *G. Modrakowski*, Über die Schwefelbestimmung im Harn mittelst Natriumperoxyd. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **38**. S. 562 (1903). Vgl. *Asboth*, Neue Methode zur Bestimmung des Schwefels in organischen Verbindungen. Chemikerzeitung. Bd. **19**. S. 2030 (1895). — *Fr. Düring*, Über die Schwefelbestimmung in verschiedenartigen animalischen Substanzen und in Haaren von Tieren verschiedenen Alters. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **22**. S. 281 (1896).

Von *Folin* [1]) ist die Natriumsuperoxyd-Methode folgendermaßen modifiziert worden.

In einem großen Nickeltiegel (200—250 *cm*³ Inhalt) werden 25 *cm*³ Harn (wenn sehr verdünnt 50 *cm*³) mit ca. 3 *g* $Na_2O_2$ bis zur Sirupkonsistenz eingedampft und vorsichtig zur Trockene gebracht. Der erkaltete Rückstand wird mit 1—2 *cm*³ Wasser befeuchtet, mit 7 *g* Natriumsuperoxyd versetzt und etwa 10 Minuten bis zum vollständigen Schmelzen erhitzt. Nach dem Erkalten während einiger Minuten löst man das Gemisch durch wenigstens ½stündiges Erhitzen mit 100 *cm*³ Wasser, spült die Lösung in einen Erlenmeyerkolben von 400—450 *cm*³, verdünnt mit heißem Wasser auf ca. 250 *cm*³, setzt zu der fast kochenden Lösung langsam konzentrierte Salzsäure, bis das Nickeloxyd gerade gelöst ist (auf 8 *g* Peroxyd 18 *cm*³ Säure), filtriert nach dem Erkalten, fügt zum Filtrate 5 *cm*³ verdünnten Alkohol (1 Teil Alkohol, 4 Teile Wasser), kocht noch einige Minuten lang und fügt dann 10 *cm*³ 10%ige Bariumchloridlösung tropfenweise hinzu. Nach zweitägigem Stehenlassen in der Kälte wird das Bariumsulfat durch Wägung bestimmt.

In neuester Zeit führen *Abderhalden* und *Funk* [2]) die Natriumsuperoxydmethode in folgender Weise aus: 10 *cm*³ Harn werden mit wenig Soda und 0·4 *g* reinem Milchzucker in einem Nickeltiegel auf dem Wasserbade zur Trockene verdampft. Der Rückstand wird nun mit 6·4 *g* Natriumsuperoxyd mit Hilfe eines Platinspatels gut gemischt. Nachdem der Tiegel in einer Porzellanschale in kaltes Wasser eingetaucht worden ist — das Wasser soll den Tiegel bis zu drei Viertel seiner Höhe bedecken —, wird sein Inhalt mit einem durch das im Deckel des Tiegels befindliche Loch eingeführten glühenden Eisennagel entzündet. Nach dem Erkalten wird der Tiegel umgestürzt, die Porzellanschale rasch mit einem Uhrglas bedeckt und nunmehr der Inhalt der Schale und des Tiegels quantitativ in ein Becherglas übergeführt. Die weitere Verarbeitung ist die gewöhnliche. Die Flüssigkeit wird mit Salzsäure angesäuert und die Schwefelsäure mit Bariumchlorid gefällt.

Verfasser haben nach dieser Methode stets sehr gute Werte erhalten. Sie läßt sicht sehr rasch durchführen. Die Verbrennung ist eine vollständige, wenn das Eintrocknen des Harns nur auf dem Wasserbade erfolgt. Wird dagegen der Rückstand im Trockenschrank oder im Exsikkator noch weiter getrocknet, so bleiben bei der Oxydation mit Natriumsuperoxyd leicht Spuren von Kohlenpartikelchen zurück. Es empfiehlt sich daher, den Harn nur auf dem Wasserbade einzudampfen und den Rückstand sofort mit Natriumsuperoxyd zu mischen.

[1]) *Folin*, On sulphate and sulphur determinations. Journ. f. biol. Chem. Bd. **1**. S. 131 (1906). — Vgl. auch: *Folin*, The determination of total sulphur in urine. Journ. Amer. chem. Soc. Vol. **31**. p. 284 (1908) und *J. W. Gill* und *H. S. Grindley*, The determination of total sulphur in urine. Journ. Amer. chem. Soc. Vol. **31**. p. 52.

[2]) *E. Abderhalden* und *C. Funk*, Die Schwefelbestimmung im Urin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **58**. S. 331. Vgl. hierzu: *H. Pringsheim*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **41**. S. 4267 (1908).

Die Bestimmung des Gesamtschwefels auf nassem Wege erfolgt bequem nach dem von *Konschegg* modifizierten Verfahren von *Schulz*:[1]) 5—10 $cm^3$ Harn werden in einem Kjeldahlkolben von 300 $cm^3$ Inhalt mit ebensoviel rauchender Salpetersäure und 1—2 $cm^3$ einer 20%igen $KNO_3$-Lösung versetzt, das Reaktionsgemisch zuerst über freier Flamme und bei Entwicklung weißer Dämpfe über einem Drahtnetz erhitzt so lange, bis keine Dampfentwicklung mehr statthat und sich am Halse des Kolbens keine Flüssigkeitstropfen mehr zeigen (etwa 1/4 Stunde). Nach dem Erkalten wird der Kolbeninhalt mit Wasser und Salzsäure versetzt, aufgekocht, die klare, farblose Lösung quantitativ in ein Becherglas gespült, die gebildete Schwefelsäure, ohne vorher die Salpetersäure mit Salzsäure abzudampfen, mit Bariumchlorid in der Siedehitze gefällt.[2])

## Gesamtschwefelsäure.

Nach *Salkowski*[3]): 100 $cm^3$ (bei konzentriertem Harn 50 $cm^3$ und 50 $cm^3$ Wasser) filtrierter, ganz klarer Harn werden mit 10 $cm^3$ Salzsäure (spez. Gew. 1·12) im Becherglas auf dem Drahtnetz zum Sieden erhitzt, ca. 10 Minuten in gelindem Sieden erhalten (dabei werden auch die gepaarten Schwefelsäuren gespalten), dann die Flamme entfernt und nach einigen Minuten vorsichtig mit 10—15 $cm^3$ vorher erhitzter Chlorbariumlösung versetzt, dann am besten bis zum nächsten Tage stehen gelassen, damit das Bariumsulfat sich gut absetzt. Oder man erhitzt das Becherglas so lange auf dem Wasserbad, bis der schwefelsaure Baryt sich abgesetzt hat und die Flüssigkeit ganz klar erscheint. Man filtriert eventuell nach dem Erwärmen auf dem Wasserbad durch ein kleines, aschefreies, dichtes Filter von 9 *cm* Durchmesser und bringt den Niederschlag mit Hilfe des Gummiwischers vollständig auf das Filter. Das Filtrat muß ganz klar sein; ist es nicht so, so klärt man es durch wiederholtes Zurückgießen auf das Filter. Das Filtrat wird mit Schwefelsäure auf genügenden Chlorbariumzusatz geprüft; man wäscht den Niederschlag mit warmem Wasser bis zur Chlorfreiheit, gießt das Filter zur Entfernung von Farbstoff und Trocknung ein- bis zweimal voll Alkohol absolut., dann einmal mit Äther. — Zur Bestimmung des

---

[1]) *Hugo Schulz*, Die quantitative Bestimmung des Gesamtschwefels im Harn. *Pflügers* Arch. Bd. **121**. S. 114 (1908). — *Konschegg*, *Pflügers* Arch. Bd. **123**. S. 274 (1908). — *Osterberg* und *Wolff*, Biochem. Zeitschr. Bd. **9**. S. 307 (1908). — *H. Schulz*, Eine Methode zur Bestimmung des Gesamtschwefels im Harn. *Pflügers* Arch. Bd. **57**. S. 57 (1894). — *P. Mohr*, Über Schwefelbestimmung im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **20**. S. 556 (1895). Vgl. hierzu auch die Anwendung von Cuprinitrat als Oxydationsmittel: *St. R. Benedikt*, Über die Bestimmung des Gesamtschwefels im Harn. Journ. of Biol. Chem. Vol. **6**. p. 363 (1909).

[2]) Zur Bestimmung des Gesamtschwefels im Harn vgl. auch: *Stanley Ritson*, A comparison of the methods for the estimation of total sulphur in urine. The Biochemical Journ. Bd. **4**. S. 337 (1909) und The use of Barium peroxyd in the estimation of total sulphur in urine. Ebenda. S. 343.

[3]) *E. Salkowski*, S. 273 und Über die quantitative Bestimmung der Schwefelsäure und der Ätherschwefelsäure im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **10**. S. 346 (1886). — *E. Salkowski*, Über die Entstehung der Schwefelsäure und das Verhalten des Tannins im tierischen Organismus. *Virchows* Arch. Bd. 58. S. 469 (1873).

Bariumsulfates bringt man das nach einigen Minuten völlig trockene Filter samt Niederschlag in einen gewogenen Platintiegel, erhitzt anfangs bei fast völlig aufgelegtem Deckel gelinde, dann bei etwas weiterer Öffnung stark ca. 5 Minuten, jedenfalls so lange, bis der Inhalt des Tiegels völlig weiß erscheint, läßt erkalten und wägt. Das geglühte Bariumsulfat glüht man mit einigen Tropfen $H_2SO_4$ nochmals und wägt. Man dampft das in den Platintiegel gebrachte $BaSO_4$, erhitzt zuerst langsam, dann glüht man. Gefundenes Gewicht mit 0·4206 multipliziert = $H_2SO_4$.

Nach *Folin.*[1])

1. Fällung in der Kälte. 25 *cm*³ Harn und 20 *cm*³ verdünnte Salzsäure (1 Teil HCl von 1·20 spez. Gew. und 4 Teile Wasser) oder 50 *cm*³ Harn und 4 *cm*³ konzentrierte HCl werden in einem Erlenmeyerkolben von 200—250 *cm*³ Inhalt 20—30 Minuten (nicht weniger als 20) gelinde, ruhig gekocht. Es ist gut, den Kolben während des Kochens mit einem Uhrgläschen bedeckt zu halten. Der Kolben wird 2—3 Minuten in fließendem Wasser gekühlt, der Inhalt mit kaltem Wasser zu ca. 150 *cm*³ verdünnt. Zu dieser kalten Lösung gibt man dann 10 *cm*³ 5%ige $BaCl_2$-Lösung, ohne daß während des Zusatzes geschüttelt wird. Sonst wird wie bei den anorganischen (siehe unten) Sulfaten verfahren.

2. Fällung in der Hitze. Das Erhitzen mit Salzsäure wird wie oben angegeben ausgeführt. Nach 20—30 Minuten wird der siedende Harn mit heißem Wasser zu ca. 150 *cm*³ verdünnt. Die Mischung wird noch einmal zu dem Siedepunkt erhitzt, vom Feuer weggenommen und gleich mit 5 *cm*³ 10%iger $BaCl_2$-Lösung gefällt. Die $BaCl_2$-Lösung muß immer tropfenweise zugefügt werden. Man filtriert etwa nach zweistündigem Stehen, wenn die Mischung Zimmertemperatur angenommen hat. Sonst verfährt man wie bei den anorganischen Sulfaten.

## Ätherschwefelsäuren.

Die Ätherschwefelsäuren bestimmt *Salkowski* direkt nach folgender Vorschrift:

Man mischt gleiche Volumina je 75 *cm*³ oder je 100 *cm*³ Harn und alkalische Chlorbariumlösung (Gemisch von 2 Volumen Barytwasser und 1 Volumen Chlorbariumlösung) in einem trockenen Becherglas unter gutem Umrühren, filtriert nach einigen Minuten durch ein nicht angefeuchtetes Filter in ein trockenes Gefäß. Von dem klaren Filtrat, das nur die in Form der ätherschwefelsauren Salze vorhandene Schwefelsäure enthält (beim Stehen tritt nachträglich Trübung ein durch Bildung von Bariumkarbonat), mißt man 160 *cm*³ ab, neutralisiert mit HCl, setzt dann noch 10 *cm*³ 10%ige Salzsäure hinzu und verfährt dann, wie bei der Bestimmung der

[1]) *Folin,* On sulphate and sulphur determinations. Journ. f. biol. Chem. Bd. **1**. S. 131 (1906). — Vgl. auch: *Folin,* The determination of total sulphur in urine. Journ. Amer. chem. Soc. Vol. **31**. p. 284 (1908) und *J. W. Gill* und *H. S. Grindley,* The determination of total sulphur in urine. Journ. Amer. chem. Soc. Vol. **31**. p. 52 (1908).

Gesamtschwefelsäure, nur fällt der weitere Zusatz von Chlorbarium fort: der nach $^1/_4$stündigem Kochen der Flüssigkeit ausgeschiedene schwefelsaure Baryt wird wie oben behandelt. Die Differenz zwischen dieser Schwefelsäure und zwischen der Gesamtschwefelsäure entspricht der Schwefelsäuremenge, die in Form von präformierter Schwefelsäure vorhanden ist.

*Folin* hingegen bestimmt die Menge der Ätherschwefelsäuren aus der Differenz zwischen Gesamt- und anorganischen Schwefelsäuren.

Die direkte Bestimmung der anorganischen Sulfate wird nach ihm wie folgt ausgeführt.

Ungefähr 100 *cm*³ Wasser (nicht weniger), 10 *cm*³ verdünnte Salzsäure (1 Volumen konzentrierter HCl zu 4 Volumen Wasser) und 25 *cm*³ Harn werden in einen Erlenmeyerkolben von 200—250 *cm*³ Inhalt gefüllt. Wenn der Harn verdünnt ist, sind statt 25 *cm*³ 50 *cm*³ und entsprechend weniger Wasser zu nehmen. Dann werden 10 *cm*³ 5⁰/₀ige Bariumchloridlösung während einer Stunde tropfenweise durch einen Tropftrichter oder Kapillare zugefügt. Während des Zusatzes von Bariumchlorid soll die Urinlösung nicht geschüttelt, gerührt oder auf eine andere Weise aufgewirbelt werden. Nach einer Stunde oder später wird die Mischung umgerührt, aufgeschüttelt und durch einen Goochtiegel filtriert. Der Niederschlag wird mit ca. 250 *cm*³ kaltem Wasser gewaschen, getrocknet und geglüht. Bei dem Glühen darf die Flamme den durchlöcherten Boden des Tiegels nicht berühren, auch nicht dessen Seite: man setzt den Tiegel am besten auf den Deckel von gewöhnlichen Platintiegeln. Der Deckel wird auf ein Dreieck gesetzt, und der Tiegel steht aufrecht, während die Flamme gegen den Platindeckel gerichtet ist. 10 Minuten Glühen genügt, wenn nicht organische Substanz anwesend ist.

Wenn viel Urin angewendet werden kann, so kann die Bestimmung der Ätherschwefelsäuren nach *Folin* auf folgende Weise ausgeführt werden:

125 *cm*³ Urin werden mit 75 *cm*³ Wasser und 30 *cm*³ verdünnter Salzsäure (1:4) versetzt. Die Mischung wird in der Kälte durch Zusatz von 20 *cm*³ 5⁰/₀iger $BaCl_2$-Lösung mittelst eines Tropftrichters versetzt. Nach einstündigem Stehen wird die Lösung durch ein trockenes Filter filtriert. 125 *cm*³ des Filtrates gelinde, nicht weniger als 30 Minuten gekocht, abkühlen lassen, filtriert, gewaschen und wie üblich geglüht.

## Neutraler Schwefel.

Zu dem im Harn neben dem vollkommen oxydierten sauren Schwefel vorkommenden „neutralen" Schwefel[1]) gehören eine Reihe von Verbindungen: Rhodanwasserstoffsäure, unterschweflige Säure, die „Proteinsäure"-Gruppe, Abkömmlinge des Cystins, Schwefelwasserstoff, Äthylsulfid, Methylmercaptan.

Der neutrale Schwefel wird bestimmt, indem man von der nach Oxydation des Harnes gefundenen Menge Schwefelsäure diejenige der Ge-

[1]) *E. Salkowski*, Über die Entstehung der Schwefelsäure etc. *Virchows* Archiv. Bd. 58. S. 172 (1873).

samtschwefelsäure, die in einer anderen Portion bestimmt wird, abzieht. Oder man oxydiert das bei der Bestimmung der Gesamtschwefelsäure gewonnene Filtrat. Bei Abwesenheit von unterschwefliger Säure wird dies nach *Salkowski* so ausgeführt, daß man das Filtrat von 50 *cm*³ ausgefälltem Harn samt dem Waschwasser zur Trockene verdunstet, die wässerige Lösung des Rückstandes nach Zusatz der Salpetermischung in einer Platinschale zur Trockene bringt und den Rückstand bei niederer Temperatur schmilzt. Die Schmelze löst man in Wasser, filtriert die Lösung von kohlensaurem Baryt ab und wäscht diesen mit Wasser aus. Löst sich der kohlensaure Baryt nicht vollständig in Salzsäure, so ist ihm noch schwefelsaurer Baryt beigemengt und er muß durch abermaliges Schmelzen mit kohlensaurem Natrium ganz aufgeschlossen werden. Im Filtrat und Waschwasser ist die Schwefelsäure wie üblich zu bestimmen.

Nach *L. Hess*[1]) wird die Bestimmung des neutralen Schwefels so ausgeführt, daß das nach dem Ausfällen der gesamten Schwefelsäure [das Aufkochen der mit HCl und $BaCl_2$ versetzten Harnmenge (mindestens 500 *cm*³) und das Digerieren auf dem Wasserbad (mindestens 6 Stunden) wird in einem Kolben vorgenommen, der einen mit Pyrogallussäure und Lauge beschickten Kugelapparat trägt] zurückbleibende Filtrat mit Natronlauge stark alkalisch gemacht und in die Lösung Chlorgas bis zur Sättigung eingeleitet wird. Das Gefäß bleibt während des Einleitens mit dem Uhrglas bedeckt. Einige Stunden später wird mit reiner Salzsäure angesäuert, das Chlor durch Erhitzen verjagt, der sich ausscheidende, feine Niederschlag von schwefelsaurem Barium wie üblich bestimmt.

Ein Teil des neutralen Schwefels ist der „leicht abspaltbare“ Schwefel und kann wie bei den Eiweißkörpern durch Kochen des Harnes mit alkalischer Bleiacetatlösung unter Zusatz von Zink nachgewiesen werden.[2])

Statt Gummistopfen sind hierbei am besten mit Stanniol überzogene Korkstopfen zu verwenden.

---

[1]) *L. Hess*, Methode zur Bestimmung des neutralen Schwefels im Harn. Berliner klin. Wochenschr. Bd. **45**. S. 1452.

[2]) Vgl.: *F. N. Schulz*, Die Bindungsweise des Schwefels im Eiweiß. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **25**. S. 16 (1898). — *Petry*, Über die Ausscheidung von leicht abspaltbarem Schwefel durch den Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **30**. S. 45 (1900). — *K. G. H. Mörner*, Zur Kenntnis der Bindung des Schwefels in den Proteinstoffen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **34**. S. 211 (1901). Bezüglich Methylmercaptan vgl.: *L. Nencki*, Das Methylmercaptan als Bestandteil der menschlichen Darmgase. Monatshefte. Bd. **10**. S. 862 (1889). — *M. Nencki*, Arch. f. exper. Path. Bd. **28**. S. 206 (1891). — *Rubner*, Über das Vorkommen von Mercaptan. Arch. f. Hygiene. Bd. **19**. S. 136 (1893). Bezüglich Cystin: *Goldmann* und *Baumann*, Zur Kenntnis der schwefelhaltigen Verbindungen des Harnes. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **12**. S. 254 (1888); Bd. **9**. S. 260 (1885). — *Br. Mester*, Beitrag zur Kenntnis der Cystinurie. Bd. **14**. S. 108 (1890). — *Baumann* und *Udránszky*, Weitere Beiträge zur Kenntnis der Cystinurie. Bd. **15**. S. 75, 87 (1891) und den Abschnitt „Aminosäuren“. Bezüglich Äthylsulfid vgl.: *Abel*, Über das Vorkommen von Äthylsulfid im Hundeharn etc. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **20**. S. 253 (1895); ferner *Huppert*, Analyse. 10. Aufl. S. 54 (1897).

Zur Bestimmung der Thioschwefelsäure ($H_2S_2O_3$) werden nach *Salkowski*[1]) 100 *cm*³ Harn mit 10 *cm*³ Salzsäure von 1·12 spez. Gew. auf $^1/_3$—$^1/_4$ abdestilliert. Dabei spaltet sich die unterschweflige Säure vollständig in Schwefel und schweflige Säure. Enthält der Harn Thioschwefelsäure, so tritt im obersten Teil des Kühlrohres ein charakteristischer Beschlag — bei Spuren nur ein bläulichweißer Hauch — von Schwefel auf. In das Destillat geht schweflige Säure über, die durch Zink und Salzsäure zu Schwefelwasserstoff reduziert wird. Man verfährt am besten so, daß man zuerst ein Zinkstäbchen in einem Schälchen mit Salzsäure übergießt, dann mit Wasser nachwäscht, nunmehr das Zinkstäbchen im Reagenzglas mit Salzsäure übergießt und das sich entwickelnde Wasserstoffgas mittelst mit basischem Bleiacetat getränktem Filtrierpapier auf Schwefelwasserstoff prüft. Ist das Gas frei von Schwefelwasserstoff, so setzt man jetzt das Destillat dazu, erwärmt gelinde und läßt eine halbe Stunde ruhig stehen: Bräunung resp. Schwärzung des Bleiacetatpapiers beweist die Gegenwart von schwefliger Säure.

Ein eventuell vorhandener geringer Gehalt an Schwefelwasserstoff ist in der Regel bei Anstellung der Reaktion auf schweflige Säure mit Zink und Salzsäure nicht störend. Der Schwefelanflug bildet sich noch, wenn im Liter Harn 0·1 *g* der Säure vorhanden ist. Noch kleinere Mengen sind nachweisbar, wenn man das Bleisalz der Säure bearbeitet. Man fällt mit Bleiessig, läßt absitzen, filtriert, bringt den Filterrückstand in einen Kolben, versetzt reichlich mit HCl und destilliert.

Ein anderes Verfahren beruht darauf, daß die Thioschwefelsäure beim Behandeln mit Silber einen Niederschlag von thioschwefelsaurem Silber bildet. Dieses Salz zerfällt beim Stehen, ganz sicher und vollständig aber beim Erhitzen in Schwefelsilber und schwefelsaurem Silber, welches in den hier in Betracht kommenden Mengen in Lösung geht. Nach *W. Presch*[2]) werden 100 *cm*³ (oder mehr) Harn mit Bariummischung zur Entfernung der präformierten Schwefelsäure gefällt, vom $BaSO_4$ abfiltriert, das Filtrat mit kohlensaurem Ammoniak unter Zusatz von $NH_3$ völlig ausgefällt, stehen gelassen, vom $BaCO_3$ abfiltriert, das Filtrat mit Salpetersäure neutralisiert, mit Silbernitrat versetzt und gelinde erwärmt. Man läßt stehen, filtriert und fügt zu dem stark eingeengten Filtrat salpetersaures Baryt zu. Es zeigt sich dann zuweilen sofort, häufig erst beim Stehen ein Niederschlag aus Chlorsilber und aus Barytsalzen. Chlorsilber und Bariumnitrat werden durch Ammoniak und durch Waschen mit Wasser entfernt. Restierendes schwefelsaures Baryt beweist Thioschwefelsäure. Es lassen sich auf diese Weise 4 *mg* Natriumthiosulfat in 100 *cm*³ Harn nachweisen.

---

[1]) *E. Salkowski*, Über das Verhalten der Isaethionsäure im Organismus und den Nachweis der unterschwefligen Säure im Harn. *Pflügers* Arch. Bd. **39**. S. 209 (1886).

[2]) *W. Presch*, Über das Verhalten des Schwefels im Organismus und den Nachweis der unterschwefligen Säure im Menschenharn. *Virchows* Archiv. Bd. **119**. S. 148, 156 (1890). Über Darstellung der Thioschwefelsäure vgl. *Schmiedeberg*, Arch. d. Heilkunde. Bd. 8. S. 422 (1867).

## Rhodanwasserstoff, CNSH.

Man fällt nach *I. Munk*[1]) 200 *cm*³ Harn mit salpetersaurem Silber unter Zusatz von Salpetersäure vollständig aus. Der abfiltrierte Niederschlag wird in Wasser verteilt, durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zerlegt, filtriert und destilliert. Man prüft das Destillat auf Blausäure, die bei der Destillation von Rhodanwasserstoff entstanden war, oder man engt nach *Bruylants*[2]) 200 *cm*³ Harn bei schwach soda-alkalischer Reaktion auf $^1/_5$ ein, säuert mit 10 *cm*³ konzentrierter Salzsäure an und schüttelt mit Äther aus. Der mit Tierkohle entfärbte Äther gibt mit Eisenchlorid Rotfärbung von Rhodaneisen.

Zur quantitativen Bestimmung des Rhodanwasserstoffes fällt *Munk* 100 *cm*³ Harn unter Zusatz von Salpetersäure und Silbernitrat vollständig aus, und bestimmt im gewaschenen Niederschlag durch Schmelzen mit Soda und Salpeter den Schwefel, aus dessen Menge die des Rhodanwasserstoffes berechnet wird. 1 Teil $BaSO_4 = 0{\cdot}253$ CNSH.

*Lang*[3]) verfuhr in der Weise, daß der Harn zuerst nach *Volhard* titriert wurde. So wurde die Gesamtmenge der im Harn enthaltenen Chloride und Rhodanide ermittelt. Dann wurde die gleiche Menge Harn in der Platinschale unter Zusatz chlorfreien Salpeters vorsichtig verascht und in der Asche das Chlor bestimmt; die Differenz beider Bestimmungen ergibt die Menge der vorhandenen Rhodanwasserstoffsäure.

Zur quantitativen Bestimmung vgl. auch das Verfahren von *Rupp*.[4]) Dieses wird nach *Edinger* und *Clemens*[5]) wie folgt ausgeführt.

50—100 *cm*³ klarer, eiweißfreier Harn werden mit sehr verdünnter Salpetersäure angesäuert, mit 3⁰/₀iger Silbernitratlösung im Überschuß (etwa 100 *cm*³) versetzt. Man erwärmt etwa 10 Minuten auf dem Wasserbad, damit der Niederschlag sich gut absetzt, eventuell unter Zusatz von etwas Kieselgur, saugt den Niederschlag ab, wäscht mit salpetersäurehaltigem Wasser aus und bringt ihn samt Filter und etwas Wasser in eine etwa 1 *l* fassende weithalsige Glasstopfenflasche. Dann fügt man bis zur alkalischen Reaktion der Flüssigkeit Natriumbikarbonat (etwa 3 *g*) und 3 *g* Jodkalium hinzu, um das Chlorsilber in Jodsilber überzuführen, löst die Salze durch sanftes Umschwenken, verteilt mit einem Glasstabe den Niederschlag und das Filter möglichst fein und läßt so lange eine bekannte

[1]) *I. Munk*, 1. Quantitative Bestimmung des Schwefelcyansäuregehaltes im Speichel. 2. Über das Vorkommen von Sulfocyansäure im Harn und ihre quantitativen Verhältnisse. *Virchows* Arch. Bd. **69**. S. 350 (1877). — *W. J. Smith-Jerome*, Über eine abnorme Schwefelausscheidung bei einer Hündin. *Pflügers* Arch. Bd. **60**. S. 233 (1895). — *L. Pollak*, Über das Schicksal der Rhodanate im tierischen Organismus. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **2**. S. 430 (1902).

[2]) Nach *Maly*, Jg. 1888. S. 135.

[3]) Vgl. *S. Lang*, Über die Umwandlung des Acetonitrits und seiner Homologen im Tierkörper. Arch. f. exper. Pharm. Bd. **34**. S. 246, 253 (1894).

[4]) *E. Rupp* und *A. Schiedt*, Über die Jodometrie des Rhodanwasserstoffs. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **35**. S. 2191 (1902).

[5]) *Edinger* und *Clemens*, Weitere Untersuchungen über die Bedeutung der Rhodanverbindungen im Tierkörper. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **59**. S. 218 (1906).

Menge $^1/_{10}$ n-Jodlösung hinzufließen, bis die Flüssigkeit deutlich braun gefärbt bleibt (im allgemeinen 20 *cm*³). Man läßt die gut verschlossene Flasche in einem dunklen Raume 2 Stunden stehen, säuert mit 10⁰/₀iger Salzsäure vorsichtig an, fügt Stärkelösung hinzu und titriert mit $^1/_{10}$ n-Thiosulfatlösung zurück. 1 *cm*³ $^1/_{10}$ n-Jodlösung entsprechen 0·0009666 *g* CNS.

### Schwefelwasserstoff.

Der Schwefelwasserstoff läßt sich durch seinen Geruch und an seiner Eigenschaft, essigsaures Blei zu schwärzen, erkennen. Zu seinem Nachweis wird der Kolben, in dem sich der Harn befindet, mit einem Kork verschlossen, in dessen unteres Ende ein mit Bleiessig und mit einem Tropfen Natronlauge besetzter Streifen Filtrierpapier eingeklemmt ist. Geringste Mengen von Schwefelwasserstoff erkennt man auch, wenn man durch den Kolben, der auf dem Wasserbade auf ca. 50⁰ erwärmt wird, ungefähr 1 Stunde Luft durchsaugt. Die eintretende Luft wäscht man in verdünnter Natronlauge; in einer zweiten Flasche, die mit verdünnter Natronlauge beschickt ist, wird der $H_2S$ adsorbiert. In der Lauge kann man den Schwefelwasserstoff auch quantitativ bestimmen, indem man das auf Zusatz von Bleilösung ausgefällte Schwefelblei auf einem Filter sammelt, trocknet, im Platintiegel verbrennt, den Rückstand in etwas Salpetersäure löst, einige Tropfen Schwefelsäure zufügt, vorsichtig eintrocknet, dann glüht und wägt. Gefundenes Bleisulfat mal 0·1124 = $H_2S$.[1])

## Eiweiß und nächste Umwandlungsprodukte.

Zum Nachweis von Eiweiß im Harn dienen folgende Proben[2]):

1. Kochprobe. Der sauer reagierende (falls nötig mit Salpetersäure ganz schwach sauer gemachte) Harn wird in einem Reagenzglas zum Sieden gebracht, dann schwach mit 2—3 Tropfen einer 25⁰/₀igen Essigsäure oder 10—20 Tropfen 25⁰/₀iger Salpetersäure — angesäuert. Bei Anwesenheit von Eiweiß entsteht ein flockiger Niederschlag.

Man kann auch den Harn in siedendes Wasser unter Zusatz einer Spur Essigsäure eintropfen lassen; bei eiweißhaltigem Harn entsteht eine rauchwolkenähnliche Trübung. *L. de Jager*[3]) empfiehlt folgende Ausführung der Kochprobe: Zu 10 *cm*³ Harn wird 1 *cm*³ einer 10⁰/₀igen Kaliumoxalatlösung zugesetzt und nach einigem Zuwarten durch doppeltes Filter, nötigenfalls wiederholt, filtriert, bis das Filtrat vollkommen klar ist. Eine Probe des Filtrats wird gekocht; entsteht ein Niederschlag, so ist mit Gewiß-

---

[1]) Über Schwefelwasserstoff im Urin vgl. u. a.: *Fr. Müller*, Über Schwefelwasserstoff im Harn. Berliner klin. Wochenschr. 1887, S. 405, 436; auch *Spaeth*, l. c. S. 95. — *I. Munk*, Phys.-chem. Mitt. *Virchows* Archiv. Bd. 69. S. 354 (1877).

[2]) Vor der Bestimmung des Eiweißes muß der Harn durch Filtrieren geklärt werden. Es muß darauf hingewiesen werden, daß die meisten Entfärbungsmittel, wie Tierkohle, Kaolin, Eisenhydroxyd, Magnesia usta, Talk, Kieselgur, Eiweiß adsorbieren, daher nicht angewandt werden dürfen. — Hier, wie auch in den übrigen Abteilungen dieses Abschnittes, konnte nur das Wesentlichste berücksichtigt werden. Ausführlichere Angaben indet man im klassischen Werke von *Huppert-Neubauer-Vogel*, Analyse des Harns. 10. Aufl. 1898. Ausgezeichnete Werke sind *Spaeth*, Die chemische und mikroskopische Untersuchung des Harnes. 3. Auflage. Leipzig 1908 und *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 8. Aufl. 1909.

[3]) *L. de Jager*, Beiträge zur Harnchemie. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 62. S. 333 (1909).

heit Eiweiß anwesend. Eine zweite Probe des Filtrats wird nach Zusatz von 2—3 Tropfen verdünnter Essigsäure gekocht. Bleibt der Harn klar, so ist gewiß kein Eiweiß anwesend. — Nach diesem Verfahren geben bereits 50 *mg* Eiweiß im Liter einen geringen Niederschlag.

2. *Heller*sche Probe. Man schichtet vorsichtig, um eine Mischung zu vermeiden, auf ca. 5 $cm^3$ konzentrierte Salpetersäure ungefähr die gleiche Menge Harn. Ein scharf begrenzter Ring in Form einer weißen Trübung zeigt Eiweiß an.

Uratreiche, konzentrierte Harne geben eine mehr diffuse Trübung; solche Harne müssen vorher verdünnt werden. Der von Mucin herrührende, unscharfe, über die Grenzschicht gelegene Ring löst sich wieder beim Umschütteln. Der von etwa vorhandenen Harzsäuren herrührende Ring löst sich in Alkohol.[1])

3. Ferrocyankalium-Essigsäureprobe. 10 $cm^3$ Harn werden bis zur stark sauren Reaktion mit Essigsäure versetzt, eine eventuell auftretende Fällung (Urate, Oxalate, mucinähnliche Substanzen usw.) abfiltriert und nach und nach 1—3 Tropfen Ferrocyankaliumlösung (1 : 40) hinzugefügt. Bei Gegenwart von Eiweiß tritt ohne Erwärmung ein feinflockiger, gelblich-weißer Niederschlag auf. Man darf keinen Überschuß an Ferrocyankalium verwenden.

4. Reaktion mit dem Reagens von *Spiegler*. Zu 4—5 $cm^3$ nötigenfalls filtrierten Harn gibt man 1 $cm^3$ 30$^0/_0$ige Essigsäure und 4 $cm^3$ von dem Reagenzgemisch (8 *g* Sublimat, 4 *g* Weinsäure, 20 *g* Glyzerin, 10 *g* Chlornatrium und 200 *g* Wasser oder nach *Jolles* 10 *g* Quecksilberchlorid, 20 *g* Bernsteinsäure und 20 *g* ClNa in 500 $cm^3$ Wasser gelöst), so daß diese Flüssigkeiten übereinander geschichtet bleiben. Bei Eiweißgehalt tritt ein deutlicher scharfer Ring auf.

Das Reagens zeigt noch 0·002$^0/_{00}$ Eiweiß an. Die Empfindlichkeit der Ferrocyankaliumprobe ist etwa 0·01$^0/_{00}$, die der *Heller*schen Probe etwa 0·02$^0/_{00}$, der Kochprobe 0·04—0·03$^0/_{00}$ Eiweiß.

Nach Essigsäurezusatz aus konzentriertem Harn ausscheidendes Uratsediment ist bereits bei Bluttemperatur wieder löslich, während ebenfalls ausfallende Albumosen sich erst beim stärkeren Erwärmen lösen. Eine Entscheidung bringt auch die mikroskopische Untersuchung.

Sehr empfindliche Proben sind auch die mit Salicylsulfosäure und mit Trichloressigsäure.

Einige Kubikzentimeter Harn werden mit einigen Kriställchen (oder mit einigen Tropfen einer 20$^0/_0$igen wässerigen Lösung) von Sulfosalicylsäure bzw. Trichloressigsäure versetzt. Bei Gegenwart von Eiweiß entsteht eine Trübung oder Niederschlag.

*Bence-Jones*scher Eiweißkörper.[2]) Erhitzt man sauren Harn, der den *Bence-Jones*schen Eiweißkörper enthält, so entsteht bei 45—60$^0$ eine Trübung, bei 50—60$^0$ eine flockige Ausfällung des Eiweißkörpers. Falls der Harn sehr salzarm ist, ist etwas konzentrierte Kochsalzlösung hinzuzufügen. Bei weiterem Erhitzen tritt wieder vollkommene Lösung ein. Beim Erkalten entsteht der Niederschlag von neuem.

Zu seiner Darstellung benutzt man seine Eigenschaft, durch Ammonsulfat aussalzbar zu sein und seine Unlöslichkeit in Alkohol. Man sättigt den eventuell vorher mit Tierkohle geschüttelten Urin mit Ammonsulfat, filtriert den massigen, zunächst stark braun gefärbten Niederschlag ab, löst ihn in Wasser und wiederholt diese Prozedur 3—4mal. Den nach dem Aussalzen gewonnenen, abgepreßten, noch feuchten Niederschlag trägt man in 3$^0/_0$ige siedende Kochsalzlösung ein unter tropfenweiser Zugabe von Salzsäure, bis Lösung erfolgt ist. Man filtriert mit Hilfe eines Heißwassertrichters. Aus dem völlig klaren Filtrat scheidet sich der Eiweißkörper aus. Man reinigt durch Dekantieren

[1]) Thymol wirkt störend! vgl. *W. Weinberger*, Thymol as a source of error in *Hellers* test for urinary protein. Journ. Amer. Med. Assoc. 1909. p. 1310.

[2]) *A. Magnus-Levy*, Über den *Bence-Jones*schen Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **30**. S. 200 (1900). — *E. Abderhalden* und *Rostoski*, Beitrag zur Kenntnis des *Bence-Jones*schen Eiweißkörpers. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 125 (1905). — *Grutterink* und *de Graaff*, Über die Darstellung einer kristallinischen Harnanalyse. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 34. S. 393 (1902). — *Fr. Voit*, Über das *Bence-Jones*sche Eiweiß. Festschr. f. *Rosenthal*. S. 117. Leipzig 1906.

und Zentrifugieren und entfernt das Kochsalz durch mehrwöchentliches Dialysieren gegen gesättigtes Chloroformwasser. Die dialysierte Flüssigkeit wird in einem Becherglas mit 2 Volumina absolutem Alkohol versetzt, der abgeschiedene Eiweißkörper abfiltriert, mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Zur Trennung des Albumins und des Globulins werden nach *Hammarsten*[1]) von dem Harn (falls er stark sauer reagiert, mit Kali- oder Natronlauge versetzt und vom Phosphatniederschlag abfiltriert) je nach dem Eiweißgehalt 25—100 $cm^3$ genommen; man füllt mit Wasser, wenn man weniger als 100 $cm^3$ genommen hat, auf 100 $cm^3$ auf. Man trägt etwa 80 *g* Magnesiumsulfat (mehr als gelöst werden kann) in fein gepulvertem Zustande ein und rührt die Mischung sanft um. Nach 24 Stunden wird die Flüssigkeit mit den Globulinflocken auf ein gewogenes, vorher mit Magnesiumsulfatlösung angefeuchtetes Filter gebracht; man rührt das zurückgebliebene Salz wiederholt mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung an, und bringt auch diese Lösung auf das Filter. Das Filter wäscht man so lange mit gesättigter Bittersalzlösung aus, bis das Filtrat weder beim Erhitzen für sich, noch nach Zusatz von etwas Salpetersäure getrübt wird. Hierauf wird der Trichter samt Filter mehrere Stunden bei 110° im Trockenschrank getrocknet, wobei das Paraglobulin unlöslich wird, dann der Filterrückstand durch Auswaschen mit heißem Wasser vom Magnesiumsulfat vollkommen befreit, mit Alkohol und Äther gewaschen, das Filter mit Rückstand bei 110° getrocknet und gewogen. Dann wird das Filter mit Rückstand verascht und der Aschengehalt vom gefundenen Globulin in Abzug gebracht. Oder man bestimmt den N-Gehalt nach *Kjeldahl*.

Bei der Bestimmung des Globulins nach *Hofmeister* und *Pohl* werden[2]) 50—100 $cm^3$ des Harns mit Ammoniak bis zum Verschwinden der sauren Reaktion versetzt, vom entstandenen Phosphatniederschlag abfiltriert und das Filtrat mit dem gleichen Volumen einer kaltgesättigten Ammoniumsulfatlösung versetzt. Sobald sich der weiße, flockige Niederschlag abgesetzt hat, bringt man ihn quantitativ auf ein vorher gewogenes aschefreies Filter und wäscht mit halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung, bis im Filtrate kein Eiweiß mehr nachzuweisen ist. Sodann wird Filter samt Trichter in die Trockenkammer gebracht und hier einige Zeit einer Temperatur von 110° ausgesetzt. Das so koagulierte Globulin wird mit siedendem Wasser, dann mit Alkohol und Äther ausgewaschen, bei 110° bis zur Gewichtskonstanz gebracht.

## I. Bestimmung des Eiweißes.

### 1. Gewichtsanalytisch nach *Scherer*.[3])

Man bringt 50 oder 100 $cm^3$ vom filtrierten, wenn nötig mit ganz verdünnter Essigsäure ganz schwach sauer gemachten Harn in eine Porzellan-

[1]) *Hammarsten*, Über Fibrinogen. *Pflügers* Arch. Bd. 22. S. 431; vgl. auch *Pflügers* Arch. Bd. 17. S. 431 u. 447; ferner Lehrbuch d. physiol. Chem. 6. Aufl. 1907. S. 644; vgl. auch *Spaeth*, l. c. S. 419.

[2]) *Fr. Hofmeister* und *Julius Pohl*, Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn und in serösen Flüssigkeiten. Arch. f. exper. Path. u. Pharm. Bd. 20. S. 426 (1886).

[3]) Nach *Neubauer-Vogel-Huppert*, Analyse des Harns. 10. Aufl. 1898. S. 840.

schale. Man erhitzt den Harn unter Umrühren bis zur großflockigen Ausscheidung des Eiweißes und Klärung der darüber stehenden Flüssigkeit, kocht dann nochmals über freier Flamme auf. Ist keine vollkommene Ausscheidung erfolgt, so muß man noch einige Tropfen Essigsäure hinzufügen und nochmals aufkochen. Das Filtrat muß eiweißfrei sein. Oder man gießt den ursprünglichen, falls nötig verdünnten Harn portionsweise unter Umrühren in bereits siedendes Wasser.

Der Niederschlag wird möglichst rasch durch ein vorher im Wägeglas bei 110—120° getrocknetes und gewogenes aschefreies Filter filtriert, das Koagulum mit heißem Wasser und nachher mit Alkoholäther gewaschen, im Wägeglas bei 110—120° getrocknet und nach dem Wägen im Platintiegel vorsichtig verbrannt. Die gewonnene Asche wird von dem gewogenen Eiweiß in Abzug gebracht. Oder man bestimmt im ausgewaschenen, koagulierten Eiweiß den Stickstoff nach *Kjeldahl*. $N \times 6{\cdot}25 =$ Eiweiß.

2. Methode nach *Esbach*.

Der sauer reagierende (oder mit Essigsäure angesäuerte) Harn wird in ein graduiertes Rohr (Albuminimeter) bis zur Marke *V* eingefüllt, darauf bis zur Marke *R* die Reagenzlösung (Lösung von 10 *g* Pikrinsäure und 20 *g* Zitronensäure im Liter Wasser) nachgefüllt, mit einem Kautschukstopfen verschlossen und ohne zu schütteln mehreremal langsam umgekehrt. Man läßt das Glas in einem Gestell aufrecht stehen und liest in dem graduierten Rohr nach 24 Stunden die Höhe des Niederschlages ab. Die Striche geben in Grammen die Eiweißmenge in 1000 $cm^3$ Harn an. Die Bestimmung ist am besten bei 18° (bei konstanter Zimmertemperatur) vorzunehmen, da die Temperatur von Einfluß ist. Harn mit höherem spez. Gew. als 1·008 und mehr als 0·4% Eiweiß ist zu verdünnen. Der Niederschlag ist noch mikroskopisch zu prüfen.[1])

3. Verfahren von *Devoto*.[2])

Der Harn bzw. die eiweißhaltige Flüssigkeit wird zur Entfernung des Eiweißes mit Ammonsulfat behandelt. Zu diesem Behufe werden 100 $cm^3$ der Flüssigkeit mit 80 *g* kristallisiertem Ammonsulfatversetzt, das Salz in der Wärme völlig zur Lösung gebracht, dann das Glas 30—40 Minuten im Dampftopf erhitzt. Damit ist die Koagulation vollendet. Das Eiweißkoagulum wird filtriert, gewaschen, getrocknet und gewogen. Die Methode ist, harnsäurereiche, konzentrierte Harne ausgenommen, für quantitative Bestimmung des Eiweißes brauchbar.

4. Methode von *Roberts*.[3])

Man verdünnt den Urin aufs zehnfache und füllt damit eine Bürette, dann bringt man in eine Anzahl Reagenzgläser, hinter denen sich ein

[1]) Vgl. von den vielen Modifikationen der *Esbach*schen Methode u. a. *K. Braungard*, Über eine Schnellmethode zur Eiweißbestimmung im Harn. Chemiker-Zeitung. Bd. **33**. S. 942 (1909). — *Aufrecht*, Deutsch. med. Wochenschr. Bd. **35**. S. 2018 (1909).

[2]) *Devoto*, Üb. d. Nachw. d. Peptons. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **15**. S. 465 (1891).

[3]) *Roberts*, The Lancet. Vol. **1**. p. 313 (1876). — *J. Stolnikoff*, Eine neue Methode für quantitative Eiweißbestimmung im Harn. *Malys* Jahrb. Bd. **6**. S. 148 (1877). — *J. Brandenberg*, Approxim. Eiweißbest. im Harn. *Malys* Jahrb. Bd. **10**. S. 265 (1880).

schwarzer Hintergrund befindet, mit einer Pipette, ohne die Glaswandung zu benetzen, eine ca. 1 *cm*³ hohe Schicht konzentrierter Salpetersäure und fügt mit einem in eine sehr feine Spitze ausgezogenen Glasröhrchen etwa das gleiche Volumen von verschiedenen bekannten Verdünnungen der eiweißhaltigen Harnlösungen mit der Vorsicht zu, daß keine Mischung der beiden Flüssigkeiten eintritt; man verfolgt mit der Uhr in der Hand das Eintreten eines eben sichtbaren bläulichweißen Ringes und legt die Probe, bei der die Ringbildung innerhalb 2—3 Minuten eintritt, für die Berechnung zugrunde. Diejenige Probe, in welcher das innerhalb 2—3 Minuten geschieht, enthält 0·0033% Eiweiß. Man erfährt den Eiweißgehalt des unverdünnten Harnes durch die Gleichung $p = \frac{k + x}{k\,30}$; p sind die Prozente Eiweiß in unverdünntem Harn, k die zu jeder Probe verwendete Menge Zehntelharn und x die zur Verdünnung verwendete Wassermenge.

## II. Nichtkoagulierbare, biuretgebende Abbauprodukte des Eiweißes.

### Nachweis nach *Hofmeister*.[1])

Ein halber Liter Harn wird mit 10 *cm*³ einer konzentrierten Lösung von Natriumacetat versetzt und dann tropfenweise bis zur bleibenden Rotfärbung eine konzentrierte Lösung von Eisenchlorid hinzugefügt; die saure Reaktion wird durch Zusatz verdünnter Natronlauge bis zur ganz schwach sauren Reaktion abgestumpft, gekocht und filtriert. Im Filtrate darf weder Eisen noch Eiweiß vorhanden sein (man prüft mit Essigsäure-Ferrocyankalium). Mucine müssen auch entfernt sein; zu diesem Zwecke fällt man den Harn mit wenig Bleizuckerlösung. Das Filtrat wird nun mit Salzsäure versetzt, dann mit Phosphorwolframsäure, solange ein Niederschlag entsteht, gefällt. Der Niederschlag wird sofort aufs Filter gebracht. Der abfiltrierte, mit ca. 3—5% $H_2SO_4$ enthaltendem Wasser gewaschene Niederschlag wird feucht mit festem Barythydrat verrieben, nach Zusatz von etwas Wasser kurze Zeit schwach erwärmt, bis die anfängliche Grünfärbung in ein reines Gelb übergegangen ist und die Mischung schließlich filtriert. Das Filtrat wird mit verdünnter Schwefelsäure vom Baryt befreit, das Filtrat alkalisch gemacht und unter Umschütteln vorsichtig und tropfenweise mit verdünnter 1%iger Kupfersulfatlösung versetzt; bei Anwesenheit von Harnpepton (nicht unter 0·1 *g*) tritt eine zuerst rosa, dann violett werdende Färbung auf.

*Salkowski*[2]) verfährt so, daß er nach der Fällung mit Phosphorwolframsäure auf dem Drahtnetz erwärmt. In wenigen Augenblicken zieht sich der Niederschlag zu einer am Boden des Glases haftenden Masse zusammen.

---

[1]) ***Hofmeister,*** Über den Nachweis von Pepton im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **4**. S. 253 (1880). — Derselbe, Über das Schicksal des Peptons im Blute. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **5**. S. 195 (1882). — Derselbe, Über die Verbreitung des Peptons im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **6**. S. 51, 264.

[2]) ***Salkowski,*** Praktikum. 3. Aufl. 1906. S. 182. — Derselbe, Über den Nachweis von Pepton im Harn. Zentralbl. f. med. Wissensch. Bd. **32**. S. 113 (1894).

Die überstehende Flüssigkeit wird möglichst vollständig abgegossen, die harzige Masse zweimal mit destilliertem Wasser abgespült. Man übergießt den Niederschlag wieder mit einigen Kubikzentimetern Wasser und löst ihn mit Natronlauge. Die zunächst tiefblaue Lösung wird auf dem Drahtnetz erwärmt; sie nimmt dabei eine schmutzig graugelbe, trübe Beschaffenheit an. Sobald dies erreicht ist, gießt man die Flüssigkeit in ein Reagenzglas, kühlt sie ab und setzt unter Umschütteln tropfenweise sehr stark verdünnte Kupfersulfatlösung hinzu. Bei Gegenwart von Pepton entsteht eine Rotfärbung.

Gegenwart von Urobilin stört die Reaktion. Man kann diesen Körper durch Chloroform entfernen (siehe unten). Die Methode von *Aldor*[1]), wobei der Phosphorwolframsäureniederschlag zur Entfernung des Urobilins mit absolutem Alkohol behandelt wird, bedarf wegen der Löslichkeit mancher Pepton-Phosphorwolframate in Alkohol einer Nachprüfung.

Nachweis des „Peptons" im Harn nach *Morawitz* und *Dietschy*.[2])

500 $cm^3$ mit saurem phosphorsauren Kalium schwach angesäuerter frischer Harn werden mit dem doppelten Volumen 96⁰/₀igen Alkohol im Wasserbad am Rückflußkühler 5—6 Stunden auf 80—90° erhitzt (das Wasserbad darf nicht bis zum Sieden erhitzt werden). Nach dem Erkalten wird filtriert, das klare Filtrat bei 50—60° auf etwa 300 $cm^3$ eingeengt, bis der Alkohol vertrieben ist und dann nach Hinzufügen von wenig verdünnter (25%iger) Schwefelsäure (2 $cm^3$ zu 100 $cm^3$ Urin) mit Zinksulfat (etwa 80 *g* auf 100 $cm^3$ eingeengten Urins) in Substanz gesättigt, über Nacht stehen gelassen, am anderen Tag durch Erwärmen auf dem Wasserbad vollkommene Lösung des Salzes herbeigeführt, dann rasch die noch warme Flüssigkeit mit der Saugpumpe filtriert; dann extrahiert man den Niederschlag zur Entfernung des Urobilins 24 Stunden mit absolutem Alkohol, löst die Substanz in Wasser und stellt damit die Biuretreaktion an.

Für den Nachweis des Peptons im Harn verfährt man nach *Devoto*[3]) und *Bang* folgenderweise: 20 $cm^3$ Harn werden mit 16 *g* gepulvertem Ammonsulfat in der Wärme behandelt; die Lösung wird einmal aufgekocht und unmittelbar nach dem Aufkochen zentrifugiert. Die Flüssigkeit gießt man ab, extrahiert den zerriebenen Rückstand einige Male mit Alkohol und erhitzt den mit einigen Kubikzentimetern Wasser versetzten Rückstand zum Sieden. Das Filtrat wird nach dem Ansäuern mit einigen Tropfen Schwefelsäure und Chloroform geschüttelt, um die Spuren Urobilin zu entfernen, das Chloroform abpipettiert und die wässerige Lösung zur Biuretreaktion verwendet.

---

[1]) *v. Aldor*, Über den Nachweis der Albumosen im Harn und über die enterogene Albumosurie. Berl. klin. Wochenschr. Bd. **36**. S. 764 u. 785 (1899).

[2]) *Morawitz* und *Dietschy*, Über Albumosurie nebst Bemerkungen über das Vorkommen von Albumosen im Blute. Arch. f. exp. Path. Bd. **54**. S. 88 (1905).

[3]) *Devoto*, Über den Nachweis des Peptons und eine neue Art der quantitativen Eiweißbestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **15**. S. 465 (1891). — *Bang*, Zum Nachweis der Albumosen im Harn. Skand. Arch. Bd. **8**. S. 272 (1898).

Sind neben Eiweiß durch Essigsäure fällbare Körper, sogenanntes Mucin, vorhanden, so müssen diese vor Anstellung der Eiweißreaktion entfernt werden. Zu diesem Zwecke werden 100—200 *cm*³ Harn bis zum spez. Gew. 1·007—1·008 verdünnt, mit Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion versetzt und in der Kälte bis zum nächsten Tag stehen gelassen; der Essigsäureniederschlag setzt sich ab, oder man filtriert nach Schütteln mit Kieselgur.

Das „sogenannte Mucin" oder sogenannte Nukleoalbumin ist nach Untersuchungen von *K. Mörner* [1]) als eine Verbindung von Eiweiß mit hauptsächlich Chondroitinschwefelsäure, daneben mit Nukleinsäure, vielleicht auch mit Taurocholsäure anzusehen. Zu ihrem Nachweis soll man nach *Hammarsten* [2]) die Salze des Harnes zuerst durch Dialyse entfernen, da diese die Ausfällung dieser „mucinähnlichen Substanzen" durch Essigsäurezusatz sehr erschweren. Man unterwirft deshalb eine möglichst große Menge Harn der Dialyse (unter Chloroformzusatz), bis die Salze entfernt worden sind. Darauf setzt man Essigsäure bis zu etwa 2‰ hinzu und läßt stehen. Der Niederschlag wird in Wasser mit möglichst wenig Alkali gelöst und von neuem mit Säure gefällt. Zur Prüfung auf Chondroitinschwefelsäure wird ein Teil längere Zeit im Wasserbade mit etwa 5% HCl erwärmt. Erhält man bei Prüfung auf Schwefelsäure und reduzierende Substanz ein positives Resultat, so ist Chondroitinschwefelsäure vorhanden; ist eine reduzierende Substanz und keine Schwefelsäure nachweisbar, so liegt wahrscheinlich Mucin vor. Erhält man weder Schwefelsäure noch reduzierende Substanzen, so wird ein Teil des Niederschlages der Pepsinverdauung unterworfen und ein anderer Teil zur Bestimmung organisch gebundenen Phosphors verwendet. Fallen diese Proben positiv aus, so muß man zur Unterscheidung zwischen Nukleoalbumin und Nukleoproteid eine besondere Untersuchung auf Nukleinbasen machen. Ein sicherer Entscheid kann nur durch die Verarbeitung sehr großer Harnmengen erreicht werden.

Die Nukleoalbumine lösen sich zum Unterschied von Mucin in starker Essigsäure; durch bis zur Sättigung eingetragenes Magnesiumsulfat werden sie aus ihren Lösungen gefällt.

---

[1]) *K. Mörner*, Untersuchungen über Proteinstoffe und der eiweißfällenden Substanzen des normalen Menschenharnes. Skand. Arch. f. Phys. Bd. **6**. S. 332 (1895). — *Oswald*, Untersuchungen über Harneiweiß. *Hofmeisters* Beitr. Bd. 5. S. 234 (1904). — *K. A. H. Mörner*, Bemerkungen zu dem Aufsatz *Oswalds*. *Hofmeisters* Beitr. Bd. 5. S. 524 (1904); vgl. ferner: *J. Joachim*, Über die Eiweißverteilung in menschlichen und tierischen Körperflächen. *Pflügers* Arch. Bd. **93**. S. 559 (1903). Vgl. noch folgende Arbeiten: *Matsumoto*, Über die durch Essigsäure ausfällbaren Eiweißsubstanzen in pathologischen Harnen. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. **75**. S. 398 (1903). — *Obermayer*, Über Nukleoalbuminausscheidung im Harn. Zentralbl. f. klin. Med. Bd. **13**. S. 1 (1892). — *Sachs*, Eine Vereinfachung der *Heller*schen Ringprobe. Deutsche med. Wochenschr. Bd. **33**. S. 66 (1907). — *Obermayer*, Eine empfindliche Reaktion auf Eiweiß im Harn. Wiener klin. Wochenschr. Bd. 5. S. 26 (1892). — *Jolles*, Eine empfindliche Probe zum Nachweis von Albumin im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **21**. S. 306 (1895). — *Polacci*, Boll. chim. Farm. Vol. **40**. p. 789 (1901). — *J. A. Macwilliam*, Remarks on a new test for albumin and other proteids. Brit. med. Journ. p. 837 (1891).

[2]) *O. Hammarsten*, Lehrb. d. physiol. Chem. 6. Aufl. S. 646 (1907).

Um das wahre Nukleoalbumin und das Mucin von dem sogenannten Nukleoalbumin oder von der mucinähnlichen Substanz zu unterscheiden, verfährt man nach *Spaeth* wie folgt.[1])

Man verdünnt den Harn mit der dreifachen Menge Wassers zur Verhinderung der lösenden Wirkung der Harnsalze auf die Nukleoalbumine und versetzt mit Essigsäure: ein entstehender Niederschlag wird auf ein Filter gebracht, gewaschen und in verdünntem Alkali gelöst. In die Lösung trägt man Magnesiumsulfat bei 30° ein, löst den entstandenen Niederschlag in Wasser, fällt nochmals mit Essigsäure, um noch Spuren von Calciumphosphat zu entfernen, und schmilzt den Niederschlag, den man nochmals mit heißem absoluten Alkohol behandelt hat, mit Soda und Salpeter. Ist in der Schmelze Phosphorsäure nachweisbar, so ist die Anwesenheit von wahrem Nukleoalbumin erwiesen.

Um wahres Mucin zu identifizieren, sammelt man den auf Essigsäurezusatz erhaltenen Niederschlag ebenfalls auf einem Filter und wäscht ihn mit warmem Alkohol (zur Entfernung etwaigen Zuckers). Dann löst man den Niederschlag in wenig, etwas Alkali enthaltendem Wasser und kocht mit einem Überschuß von verdünnter Salzsäure. Man teilt die Lösung in zwei Teile. Ein Teil wird alkalisch gemacht und mit der Reduktionsprobe auf Kohlehydrate geprüft. Vorhandensein der Reduktion kann auf echtes Mucin hinweisen. Der andere Teil wird mit Bariumchlorid behandelt, um eventuell vorhandene Schwefelsäure nachzuweisen. Tritt eine Fällung ein, so war eine Verbindung von Chondroitinschwefelsäure mit Eiweiß („sogenanntes Nukleoalbumin", „sogenanntes Mucin") vorhanden. Ist keine Schwefelsäure vorhanden, so ist echtes Mucin zugegen.

## Aminosäuren.

Isolierung der Aminosäuren aus dem Urin. (Im wesentlichen nach *E. Abderhalden.*[2])

Von den Aminosäuren sind im Harn die in Wasser schwer löslichen Tyrosin, Leucin, Cystin und eventuell Aminovaleriansäure direkt zu gewinnen.

Zur Isolierung dieser Aminosäuren wird der Urin mit der zehnfachen Menge Wasser verdünnt, mit einem nicht zu großen Überschuß von basischem Bleiacetat gefällt, vom entstehenden Niederschlag abfiltriert und im Filtrat das gelöste Blei durch Schwefelwasserstoff entfernt. Durch Durchleiten von Luft oder Kohlensäure wird der Schwefelwasserstoff aus dem Filtrat entfernt. Alle Niederschläge müssen gründlich ausgewaschen werden. War der Urin nicht klar, so wird er nach dem Verdünnen mit Wasser filtriert und der Filterrückstand auf etwa vorhandene Aminosäuren untersucht.

Das von Schwefelwasserstoff befreite Filtrat wird zur Kristallisation eingeengt: Tyrosin und Leucin kristallisieren, wenn in größeren Mengen vorhanden, aus. Die Anwesenheit von Tyrosin kann durch den positiven Ausfall der *Millon*schen Reaktion leicht festgestellt werden. Durch fraktionierte Kristallisation läßt sich das schwerer lösliche Tyrosin (bei 20° 1 Teil in 2454 Teilen Wasser) vom Leucin trennen.

Für Leucin ist sein Kupfersalz charakteristisch (siehe Band **2**, S. 480). Man erhält es aus seiner wässerigen Lösung mit frisch gefälltem Kupferoxyd. Die Lösung färbt sich hierbei ganz schwach blau. Beim Abkühlen

[1]) l. c. S. 436.

[2]) Vgl.: *Brugsch-Schittenhelm*, Lehrbuch klinischer Untersuchungsmethoden. Berlin 1908. S. 565.

der vom überschüssigen CuO abfiltrierten Lösung fällt das Leucinkupfer in Form blaßblauer, fast weißer Blättchen aus. Es ist außerordentlich schwer löslich in Wasser. Um es vollständig zu gewinnen, muß der Kupferoxydrückstand so lange mit Wasser ausgekocht werden, bis die Lösung farblos bleibt. Auch Aminovaleriansäure könnte direkt durch Kristallisation gewonnen werden. Die Löslichkeit in Wasser der Aminovaleriansäure ist größer als bei Leucin, aber geringer als bei den übrigen Aminosäuren (bei 15° in 11·7 Teilen Wasser). Die Kupfersalze beider Aminosäuren sind durch fraktionierte Kristallisation nicht voneinander zu trennen. Hingegen kann das optische Verhalten der isolierten Substanz darüber Aufklärung geben, ob Leucin oder Aminovaleriansäure vorliegt. Leucin zeigt in 20%iger HCl gelöst eine spezifische Drehung von + 15·9°, Aminovaleriansäure von + 28·8°. Cystin kann ebenfalls direkt aus dem Urin gewonnen werden. Es ist charakterisiert durch seine regelmäßigen sechsseitigen Tafeln und durch seinen Schwefelgehalt. Zu seiner Isolierung wird der zuvor mit basischem Bleiacetat behandelte Urin eingeengt, mit Eisessig in Überschuß versetzt und bei niedriger Temperatur 24—48 Stunden stehen gelassen. Vorhandenes Cystin scheidet sich ab. Das entstandene Sediment wird in 10%igem $NH_3$ gelöst und nun zu der Lösung vorsichtig soviel Eisessig zugesetzt, daß sie noch schwach alkalisch bleibt. Tritt nach einiger Zeit keine Fällung ein (dies ist der Fall, wenn Tyrosin vorhanden ist), dann wird mit Eisessig übersättigt. Durch wiederholtes Lösen in Ammoniak und Fällen mit Eisessig wird der Körper gereinigt.

Zur quantitativen Isolierung von Cystin im Urin verfährt man nach *Gaskell*[1]) so, daß der Urin mit Ammoniak alkalisch gemacht und dann zur Fällung der Phosphate und Oxalate mit Calciumchlorid versetzt wird. Es wird filtriert und zu dem Filtrat das gleiche Volumen Aceton zugefügt; dann wird mit Essigsäure eben sauer gemacht. Nach 2—3tägigem Stehen scheiden sich die Kristalle aus.

Nach einem älteren Verfahren von *Goldmann* und *Baumann*[2]) wird das Cystin aus dem Harn als Benzoylcystin gewonnen. Die Tagesmenge Harn wird mit 200 $cm^3$ 10%iger Natronlauge versetzt und mit 20—25 $cm^3$ Benzoylchlorid so lange geschüttelt, bis der Geruch des Chlorids verschwunden ist. Das Filtrat wird mit Schwefelsäure stark angesäuert, dreimal mit seinem Volumen Äther ausgeschüttelt, nach dem Abdestillieren des Äthers der flüssige Destillationsrückstand mit Natronlauge neutralisiert, mit 3—4 Volumen 12%iger Natronlauge vermischt und in die Kälte gestellt. Es scheidet sich die Natriumverbindung des Benzoylcystins in Nadeln und Plättchen aus. Die Kristalle werden abgesaugt, mit wenig kalter Natronlauge, darauf mit kaltem Wasser gewaschen, wobei das Benzoylcystin in

[1]) *J. F. Gaskell*, A method of quantitativ estimation of cystin in urine. Journ. of Physiol. Vol. **36**. p. 142 (1907/8). — Vgl. auch: *Rothera*, Experiments on cystin and the relation to sulphur metabolism. Journ. of Physiol. Vol. **32**. S. 175 (1905).

[2]) *E. Goldmann* und *E. Baumann*, Zur Kenntnis der schwefelhaltigen Verbindungen des Harnes. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **12**. S. 254 (1888).

Lösung geht. Aus der wässerigen Lösung fällt man das Benzoylcystin durch Salzsäure.

*Abderhalden* (l. c.) weist auch darauf hin, daß die direkte Isolierung der Aminosäuren mißlingen kann, auch wenn sie in reichlicher Menge vorhanden sind. Namentlich kommt dies vor, wenn der Urin nicht ganz frisch oder aus sonstigen Ursachen reich an Ammoniak ist. In diesem Falle wird der Urin am besten unter vermindertem Druck völlig zur Trockene verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst. Die Kristallisation von Leucin und Tyrosin erfolgt jetzt oft leicht, selbst aus relativ recht verdünnten Lösungen. Oder man kann auch so verfahren, daß der Harn mit Phosphorwolframsäure gefällt und aus dem Filtrat der Überschuß mit Baryt entfernt wird.[1]) Der überschüssige Baryt wird genau mit $H_2SO_4$ gefällt und das Filtrat auf Aminosäuren verarbeitet. Die Phosphorwolframsäure muß jedoch in jedem Einzelfalle genau mittelst bestimmter Aminosäurelösungen und namentlich von Gemischen von Aminosäuren auf ihr Fällungsvermögen geprüft werden, denn die einzelnen Phosphorwolframsäurepräparate verhalten sich den Aminosäuren gegenüber sehr verschieden und fällen zum Teil Monoaminosäuren schon aus großer Verdünnung aus.

Die Isolierung der Aminosäuren kann mittelst der Estermethode natürlich auch an dem Urin ausgeführt werden.[2]) Der unter vermindertem Druck zur Trockene verdampfte Urin wird mit absolutem Alkohol übergossen und trockene gasförmige HCl bis zur Sättigung eingeleitet. Die Salze des Urins bleiben dabei ungelöst und werden abfiltriert. Das weitere Verfahren ist an anderer Stelle ausführlich geschildert (vgl. Band **2**, S. 470).

Einstweilen vorteilhafter ist bei der Untersuchung des Harns auf Aminosäuren, diese in bestimmte, wohlcharakterisierte, schwerlösliche Derivate zu überführen. Solche Derivate sind die β-Naphtalinsulfoverbindungen, die Naphtylisocyanatverbindungen, die Benzoylverbindungen, die Phenylisocyanatverbindungen. Am besten ausgearbeitet und am meisten geübt ist die β-Naphtalinsulfochloridmethode.[3])

[1]) *Abderhalden*, Klinische Eiweißuntersuchungen. Zeitschr. f. exper. Path. u. Therapie. Bd. **2**. S. 642 (1905).

[2]) *Abderhalden* und *Barker*, Der Nachweis von Aminosäuren im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **42**. S. 524 (1904). — *Abderhalden* und *Rona*, Über die Verwertung der Abbauprodukte des Kaseins im tierischen Organismus. Ebenda. Bd. **44**. S. 205 (1905).

[3]) *E. Fischer* und *P. Bergell*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **35**. S. 3733 (1902). — Über die Methodik vgl. die Arbeiten: *E. Abderhalden* und *E. Bergell*, Über das Auftreten von Monoaminosäuren im Harn von Kaninchen nach Phosphorvergiftung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **39**. S. 464 (1903). — *E. Abderhalden* und *Lewellys F. Barker*, Der Nachweis von Aminosäuren im Harne. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **42**. S. 524 (1904). — *E. Abderhalden* und *A. Schittenhelm*, Ausscheidung von Tyrosin und Leucin in einem Falle von Zystinurie. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **45**. S. 468 (1905). — *A. Ignatowski*, Über das Vorkommen von Aminosäuren im Harn, vorzugsweise bei Gicht. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **42**. S. 371 (1904). — *Fr. Samuely*, Zur Frage der Aminosäuren im normalen und pathologischen Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **47**. S. 376 (1906). — *Lipstein*, *Hofmeisters* Beitr. Bd. **7**. S. 527 (1905). — *Gunnar Forssner*, Über das Vorkommen von freien Aminosäuren im Harne und deren Nachweis. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **47**. S. 15 (1906).

Diese wird wie folgt ausgeführt [1]):

Der Urin wird verdünnt mit Bleiacetat gefällt (bei stärkerer Konzentration könnte das schwer lösliche etwa vorhandene Leucinblei ausfallen); es ist auch vorteilhaft, das Urinfiltrat vor der Bleifällung unter vermindertem Druck zur Trockene zu verdampfen, um möglichst viel Ammoniak zu entfernen. Die Ammoniakverbindung des β-Naphtalinsulfochlorids — β-Naphtalinsulfamid (feine Blättchen, Schmelzpunkt bei 217° [korr.]) — stört die spätere Untersuchung sehr und kann, bei ungenügender Kenntnis der Verhältnisse, zu Verwechslung mit den Derivaten der Aminosäuren Anlaß geben.

Ist der Harn eingedampft, so wird der Rückstand wieder in Wasser gelöst, mit n-NaOH alkalisch gemacht. Die Reaktion muß deutlich alkalisch sein, ein großer Überschuß an Alkali ist aber zu vermeiden. Der Urin wird nun in eine Stöpselflasche gebracht, eine ca. 10%ige Lösung von ganz reinem Naphtalinsulfochlorid in Äther zugefügt und das Gemisch auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Am besten wird alle 1/2 Stunde die Reaktion der Flüssigkeit kontrolliert und diese durch Zusatz von n-NaOH stets deutlich alkalisch gehalten. Nach 6—8 Stunden wird die Lösung im Scheidetrichter getrennt, die wässerige Lösung filtriert. Nun wird zum Filtrat so viel Salzsäure zugesetzt, bis die Lösung deutlich sauer reagiert. Bei Anwesenheit von Aminosäuren tritt Trübung, oft Abscheidung eines Öles und auch von festen Produkten ein. Ist die Fällung eine reichliche, so kann sie oft durch Abkühlen und längeres Stehen zur Kristallisation gebracht werden, oder es gelingt wenigstens, die anfangs ölige Masse zur Erstarrung zu bringen. In diesen Fällen gießt man die überstehende Lösung ab und reinigt das erhaltene Rohprodukt durch Lösen in Alkali und Fällen mit Säure.

Erhält man, wie meist, nur eine diffuse Trübung oder eine schmierige, nur zum Teil erstarrende Masse, so ist es besser, die saure Lösung auszuäthern. Die abgehobene Ätherschicht wird so lange mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser keine Chlorreaktion mehr gibt, und nun wird der Äther verdampft. Das zurückbleibende Rohprodukt ist nicht auch nur annähernd rein; es enthält fast immer das β-Naphtalinsulfamid. Um dies zu entfernen, wird das Rohprodukt mit verdünntem Ammoniak behandelt; das Amid bleibt hierbei ungelöst. Diese Trennung gelingt jedoch nur dann ohne Verluste, wenn vorher das Rohprodukt durch Lösen in Wasser, verdünntem Alkali oder in verdünntem Alkohol und Kochen der Lösung mit Tierkohle möglichst gereinigt worden ist. Es ist auch darauf zu achten, daß Naphtalinsulfosäure entstanden sein kann. Auch Hippursäure kann bei der Ausätherung der sauren Lösung in den Äther gehen; ihre Menge ist jedoch meist so gering, daß sie nicht stört. Man kann auch den Harn von vornherein, vor dem Zusatz des β-Naphtalinsulfochlorids, wie *Ignatowski* ausäthern und so Hippursäure, Phenole, Oxysäuren entfernen. Noch bequemer erfolgt die Entfernung der Hippursäure durch 5—6maliges Schütteln des Harnes mit Essigäther.

[1]) Genau nach *Abderhalden,* l. c. S. 567.

Das so gereinigte Rohprodukt muß durch Lösen in schwach ammoniakalischem Wasser, Fällen mit Säure und Ausäthern, weiterhin durch Fraktionierung, Umkristallisieren gereinigt werden. Die gewonnenen Verbindungen der Aminosäuren müssen durch die physikalischen Konstanten (Schmelzpunkt, Löslichkeit etc.), Elementaranalyse, identifiziert werden.

Die (korr.) Schmelzpunkte der einzelnen Verbindungen sind:

| | | |
|---|---|---|
| β-Naphtalinsulfoglyzin . . . . | 159°, | nach vorherigem Sintern bei 151° |
| β-Naphtalinsulfo-d-alanin | | |
| kristallwasserhaltig . . | 79—81°, | „ „ „ „ 62° |
| kristallwasserfrei . . | 122—123°, | „ „ „ „ 117° |
| β-Naphtalinsulfo-l-leucin + $H_2O$ . . | 68°, | „ „ „ „ 60° |

β-Naphtalinsulfo-l-serin, kristallisiert mit und ohne Kristallwasser. Schmilzt bei 220°.

Di-β-naphtalinsulfotyrosin sintert bei 250°, kristallisiert mit und ohne Kristallwasser. Schmilzt bei 252—254°. Gibt keine Rotfärbung mit *Millons* Reagens.

β-Naphtalinsulfo-α-prolin mit 1 Molekül Kristallwasser, beginnt bei 80° zu sintern, bei 133·7° (korr.) ist die ganze Masse geschmolzen; die bei 90° getrocknete Substanz schmilzt, ohne sich vorher zu verändern, bei 138° (korr.).

Es ist noch zu erwähnen, daß man beim Schütteln von Urin mit β-Naphtalinsulfochlorid in alkalischer Lösung oft eine Ausscheidung von schwer löslichen Produkten beobachtet. Dies kann auf der Bildung des Alkalisalzes des Di-β-naphtalinsulfotyrosins oder des Naphtalinsulfotryptophans beruhen. Diese Verbindungen sind schwer löslich in Wasser. Es kann aber auch das Natriumsalz der Naphtalinsulfosäure zur Abscheidung gelangen.

Zur Trennung von vorhandenem Lysin, Arginin und Histidin[1]) von den übrigen Aminosäuren wird der Harn mit Vorteil mit Phosphorwolframsäure gefällt. Diese „Diaminosäuren" fallen mit Phosphorwolframsäure aus und können durch Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlages mit Baryt wieder gewonnen werden.

Zur Gewinnung von reinem β-Naphtalinsulfoglyzin aus dem Rohprodukt genügt oft einfaches Umkristallisieren aus warmem Wasser. Oft ist jedoch der Weg über das Bariumsalz nach *Abderhalden* und *Bergell* vorteilhafter. Das Gemenge wird mit ca. der 10fachen Menge Wasser übergossen und dann vorsichtig mit Ammoniak versetzt. Die zunächst nicht vom ungelösten Rückstand getrennte Flüssigkeit wird auf dem Wasserbade so lange erwärmt, bis die Reaktion annähernd neutral ist und bleibt bis zum nächsten Tag bei Zimmertemperatur stehen. Der Filterrückstand wird mit kaltem Wasser gewaschen, aus heißem Wasser umkristallisiert (Naphtalinsulfamid). Die Lösung der leichtlöslichen Ammonsalze wird nochmals angesäuert, der dickwolkige Niederschlag ausgeäthert, die vereinigten ätherischen Auszüge mit Wasser gewaschen, der nach Abdestillieren des

[1]) Über Histidin im normalen Harn vgl. *England,* Über den Nachweis organischer Basen im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 57. S. 49 (1908).

Äthers zurückbleibende Rückstand in Ammoniak gelöst, der Ammoniak in der Wärme verjagt, die verdünnte Lösung mit einer Lösung von Bariumchlorid gefällt. Man saugt den Niederschlag ab, wäscht mit wenig Wasser, zerlegt mit Salzsäure, nimmt die freien Naphtalinsulfoaminosäuren sofort in Äther auf. Der nach dem Verdunsten des Äthers zurückbleibende amorphe Rückstand wird aus warmem Wasser umkristallisiert.

Im einzelnen wären zu diesem Verfahren folgende Bemerkungen hinzuzufügen:

*Embden* und *Reese*[1]) schlugen vor, den Harn nicht eben alkalisch, sondern stark alkalisch zu machen, nachdem der Harn mit so viel Alkali versetzt worden ist, daß blaues Lackmuspapier eben nicht gerötet wurde (auf den Liter Harn 20—40 $cm^3$ n-NaOH, da nur dann der Nachweis von Aminosäuren sicher gelingen sollte. Da bei der stark alkalischen Reaktion die Gefahr einer sekundären Entstehung der Aminosäuren aus höheren Verbindungen (Polypeptiden) nicht ausgeschlossen ist[2]), so ist diese Modifikation doch nur mit einem gewissen Vorbehalt dann zu verwenden, wenn man sicher nur die Menge der im Harn bereits vorgebildeten Aminosäuren feststellen will.

Die Schüttelungen bei alkalischer Reaktion mit der β-Naphtalinsulfochloridlösung können 2 Tage unter öfterem Alkali- und Reagenzzusatz (4—6mal pro Tag) wiederholt und jedesmal auf mehrere Stunden ausgedehnt werden. *Embden* wiederholt die Schüttelungen, bis beim Ansäuern keine Reaktionsprodukte mehr ausfallen. Im allgemeinen dürfte eine zweimalige Wiederholung der Schüttelung vollkommen genügend sein.

Schüttelt man ganz kurze Zeit nach *Embden* (1—4 Stunden), so wurden von *Embden* und *Marx*[3]) zwar wesentlich geringere Mengen Rohprodukt, dagegen recht erhebliche Ausbeuten an völlig oder nahezu reinem β-Naphtalinsulfoglykokoll erhalten. Der Grund ist, daß das Glykokoll besonders rasch mit β-Naphtalinsulfochlorid reagiert und daher mit weniger anderen Reaktionsprodukten verunreinigt ist. Oft ist das nach kurz dauerndem Schütteln gewonnene Reaktionsprodukt von vornherein nahezu frei von β-Naphtalinsulfamid. Jedenfalls kann nach Abtrennung des Amids durch einfaches Umkristallisieren aus warmem Wasser (*Samuely*) sehr leicht analysenreine Glykokollverbindung in oft reicher Menge erhalten werden *(Embden, Marx)*.[4])

---

[1]) *G. Embden* und *H. Reese*, Über die Gewinnung von Aminosäuren aus normalem Harn. *Hofmeisters* Beitr. Bd. 7. S. 411 (1905).

[2]) Vgl.: *Neuberg* und *Wohlgemuth*, Med. Klinik. Jg. **1906**. S. 227.

[3]) *G. Embden* und *Marx*, Über das Glykokoll des normalen Harns. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **11**. S. 308 (1908). — *M. Plaut* und *H. Reese*, Über das Verhalten in den Tierkörper eingeführter Aminosäuren. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **7**. S. 425 (1906).

[4]) Vgl.: *Bingel*, Über die Gewinnung von Glykokoll aus dem normalen Blute mit Hilfe der β-Naphtalinsulfochlorid-Methode. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **57**. S. 382 (1908).

In neuester Zeit hat *V. Henriques*[1]) die von *S. P. L. Sörensen*[2]) angegebene Formoltitrierung mit Vorteil für die Bestimmung der Aminosäuren im Harn verwenden können. Diese Titriermethode gründet sich auf die Tatsache, daß, wenn zu einer Aminosäurelösung eine neutralisierte Formollösung zugesetzt wird, die Aminogruppe unter dem Einfluß des Formols eine Methylenverbindung bildet; infolgedessen ist es möglich, die Menge der vorhandenen Karboxylgruppen titrimetrisch zu bestimmen. Folgende Gleichung veranschaulicht den Prozeß:

$$R.CH(NH_2).COOH + HCOH = R.CH(N:CH).COOH + H_2O.$$

Die Bestimmung wird nun im Harn wie folgt ausgeführt.

In einem 100 *cm*³-Meßkolben werden 50 *cm*³ Urin abgemessen, Phenolphtalein (1 *cm*³ einer $^1/_2\%$igen Lösung) und 2 *g* festes Bariumchlorid hinzugefügt. Nach Umrühren wird eine gesättigte Lösung von $Ba(OH)_2$ bis zur roten Farbe und darauf noch 5 *cm*³ (zur Entfernung der Phosphate) zugefügt; nun füllt man bis 100 *cm*³ auf, schüttelt gut und läßt den Kolben ca. 15 Minuten lang stehen, worauf man durch einen trockenen Filter filtriert. 80 *cm*³ des klaren roten Filtrates (= 40 *cm*³ Harn) werden in einen 100 *cm*³-Meßkolben gebracht, worauf man die Flüssigkeit durch Zusatz von $^1/_5$ n-HCl mit Lackmuspapier als Indikator neutralisiert und bis auf 100 *cm*³ verdünnt. In gleichen Teilen, z. B. in 40 *cm*³ (= 16 *cm*³ Harn), bestimmt man in dem einen Teil das Ammoniak (nach *Krüger-Reich-Schittenhelm* oder nach *Folin-Schaffer*), während im anderen die Formoltitrierung nach *Sörensen* ausgeführt wird.

Zu der Ausführung der Titrierung sind nötig: *a)* eine Lösung von 0·5 *g* Phenolphtalein in 50 *cm*³ Alkohol + 50 *cm*³ Wasser und *b)* eine Formolmischung, die für jede Versuchsreihe frisch hergestellt werden muß. 50 *cm*³ käuflichem (30—40%igem) Formol werden 1 *cm*³ Phenolphtaleinlösung und danach $^1/_5$ n-Barytlauge bis zum ganz schwachen rosa Farbenton zugesetzt. Als Kontrollösung wird 20 *cm*³ ausgekochtes, destilliertes Wasser benutzt. Es werden erst 10 *cm*³ Formolmischung, danach ca. 5 *cm*³ Barytlauge zugesetzt, wonach mit $^1/_5$ n-HCl zurücktitriert wird. Bei dieser Rücktitrierung wird die Salzsäure unter Schütteln zugetröpfelt, bis die Flüssigkeit nur einen schwachen rosa Farbenton hat (1. Stadium), darauf wird 1 Tropfen Baryt zugesetzt, wonach eine deutlich rote Farbe auftritt (2. Stadium). Der zu untersuchende Harn wird nun bis zu dieser letzten Farbenstärke titriert, indem 20 *cm*³ der Flüssigkeit 10 *cm*³ Formolmischung zugesetzt werden und gleich darauf $^1/_5$ n-Barytlauge bis zur Rotfärbung; dann wird mit $^1/_5$ n-Salzsäure zurücktitriert, bis die Farbe der Lösung schwächer als die der Kontrollösung erscheint, und schließlich wird Barytlauge zugetröpfelt, bis die Farbe der Kontrollösung wieder erreicht worden ist. Wenn alle vorliegenden Proben auf diese Weise titriert worden sind (bis zum „2. Stadium"),

---

1) *V. Henriques,* Über quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Harne. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60. S. 1 (1909).

2) *S. P. L. Sörensen,* Enzymstudien. Biochem. Zeitschr. Bd. 7. S. 45 (1908).

werden der Kontrollösung weiter 2 Tropfen Barytlauge zugesetzt, wodurch diese eine stark rote Farbe annimmt. Die Titrierung der Analysen wird dann vollendet, indem jeder Lösung Barytlauge zugetröpfelt wird, bis die stark rote Farbe der Kontrollösung erreicht worden ist. Statt $^1/_5$ n-Barytlauge kann auch $^1/_5$ n-Natronlauge angewandt werden. Die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter $^1/_5$ n-Lauge mit 2·8 multipliziert, gibt die Stickstoffmenge in Milligramm an, die nach Abzug des Ammoniakstickstoffs der Menge des Aminosäurestickstoffs entspricht. Zusatz von Toluol zu dem Harn zwecks Sterilisierung stört die Bestimmung nicht. Hingegen geben β-Oxybuttersäure und andere schwache Säuren in pathologischen Harnen wahrscheinlich zu merkbaren Fehlern Anlaß. Harnstoff, Kreatin, Kreatinin verhalten sich wie völlig neutrale Stoffe, auch die Gegenwart von Hippursäure übt keinen Einfluß aus. Sind Polypeptide im Harn vorhanden, so erniedrigt sich die Menge des Aminosäurestickstoffs, je mehr Aminoäuren miteinander verbunden sind. Mittelst Formoltitrierung vor und nach dem Kochen mit starker Salzsäure ließ sich auch entscheiden, ob Polypeptide im Harn vorhanden sind.[1])

## Kynurensäure.

Kynurensäure, $C_{10}H_7NO_3$, γ-Oxy-β-Chinolinkarbonsäure, bildet feine farblose Nadeln. Schmilzt bei 266—267° unter Kohlensäureentwicklung. Fast unlöslich in kaltem Wasser, in heißem zu 0·1%, schwer löslich (in 500 Teilen) in kaltem Alkohol, nicht unbeträchtlich in heißem; etwas löslich in Äther. Leicht löslich in Alkalihydraten und kohlensauren Alkalien. Bei Gegenwart von freien Mineralsäuren entsteht ein Niederschlag mit Phosphorwolframsäure noch in einer Verdünnung von 1:4000; bei einer Verdünnung von 1:12.000 schwache Trübung. — Das Barytsalz $(C_{10}H_6NO_3)_2Ba + 3H_2O$ bildet dreieckige, übereinander geschichtete glänzende Plättchen oder Nadeln.

Zum Nachweis dient die von *Jaffé*[2]) beschriebene empfindliche Reaktion: die Kynurensäure wird im Porzellanschälchen mit Salzsäure und chlorsaurem Kalium versetzt und auf dem Wasserbade oder vorsichtig über freier Flamme zur Trockene abgedampft, gibt einen rötlichen Rückstand (zum Teil Tetrachloroxykynurin), der beim Anfeuchten mit Ammoniak sich zunächst braungrün, nach kurzer Zeit smaragdgrün färbt.

---

[1]) Vgl.: *V. Henriques* und *S. P. L. Sörensen*, Über die quantitative Bestimmung der Aminosäuren, Polypeptide und der Hippursäure im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **63**. S. 27 (1909). — Zu der Formolmethode vgl. auch die Arbeiten von *H. Malfatti*, Die Formoltitrierung der Aminosäuren im Harn. Ebenda. Bd. **61**. S. 499 (1909) und *L. de Jager*, Beiträge zur Harnchemie. Ebenda. Bd **62**. S. 333 (1909). — *Malfatti* titriert die Aminosäuren im Harn direkt, nachdem das Ammoniak aus dem Harn durch Fällung entfernt worden war. In etwa 50 *cm*³ Harn werden 2—4 *g* Quecksilberchlorid gelöst und dann in kleinen Portionen gepulvertes kohlensaures Natrium eingetragen, bis sich eben merkliche alkalische Reaktion auf Lackmuspapier zeigt. Die entstandene Fällung wird abfiltriert, das Filtrat rasch mit einigen Tropfen Eisessig versetzt und nun durch Schwefelwasserstoff das überschüssige Quecksilber daraus entfernt. Von dem entstandenen Quecksilbersulfid wird wiederum abfiltriert und eine gemessene Menge des Filtrates nach Entfernung der Kohlensäure und des Schwefelwasserstoffs mit Formol titriert. Vgl. auch *T. Yoshida*, Biochem. Zeitschr. Bd. **23**. S. 239 (1909).

[2]) *M. Jaffé*, Eine empfindliche Reaktion auf Kynurensäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **7**. S. 399 (1882).

Die Intensität der Färbung nimmt beim Stehen an der Luft erheblich zu. Beim Erwärmen geht die grüne oder blaugrüne Farbe in einen schmutzigvioletten Ton über.

Bei der Darstellung nach *Hofmeister*[1]) werden größere Mengen Harn mit 0·1 Volumen konzentrierter Salzsäure, dann mit Phosphorwolframsäure, solange Niederschlag entsteht, versetzt, abfiltriert, der Niederschlag mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen, der Niederschlag abgepreßt und in der Wärme mit Ätzbaryt zerlegt. Das Filtrat wird von gelöstem Baryt durch Kohlensäure befreit, eingedampft und noch warm mit Salzsäure bis zu stark saurer Reaktion versetzt. Es fällt ein brauner Niederschlag von Kynurensäure.

Darstellung von *Jaffé*.[2]) Der Harn wird bis zur Trockene eingedampft und auf dem Wasserbade so lange mit immer neuen Portionen von Alkohol extrahiert, bis das heiße Filtrat farblos bleibt. Die vereinigten alkoholischen Auszüge werden eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst, mit konzentrierter Salzsäure versetzt.[3]) Nach 24 Stunden wird der Niederschlag auf gewogenem Filter gesammelt, mit Wasser, Schwefelkohlenstoff und Äther gewaschen, gewogen oder man säuert den im Wasser gelösten Sirup mit verdünnter Schwefelsäure an und schüttelt mit Äther kräftig durch. Die Kynurensäure scheidet sich nach 24 Stunden ziemlich rein aus.

Darstellung nach *Capaldi*.[4]) Der Harn wird mit 50% einer 10%igen Bariumchloridlösung, die 5% konzentrierten Ammoniak enthält, vermischt, das Filtrat bis auf $^1/_3$ der benutzten Harnmenge eingedampft und mit 4% konzentrierter Salzsäure versetzt. Der Niederschlag wird nach 16—24 Stunden abfiltriert, mit 1%iger Salzsäure ausgewaschen, in ein Becherglas gespritzt und in Ammoniak gelöst. Die Lösung wird auf dem Wasserbad bis zum Verschwinden des freien Ammoniaks erwärmt, filtriert und wieder mit 4% konzentrierter Salzsäure versetzt. Der entstandene weiße Niederschlag wird nach etwa 6 Stunden durch ein gewogenes Filter filtriert, mit 1%iger Salzsäure und zweimal mit Wasser gewaschen, bei 100° getrocknet und gewogen.[5])

[1]) *Fr. Hofmeister*, Über die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen des Harns. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **5**. S. 67 (1881).

[2]) *H. Fühner*, Zur Talleochininreaktion des Chinins und der Kynurensäurereaktion von *Jaffé*. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **38**. S. 2713 (1905).

[3]) *A. Hauser*, Untersuchungen über die Kynurensäurebildung im Organismus. Arch. f. exper. Path. u. Pharm. Bd. **36**. S. 1 (1895).

[4]) *A. Capaldi*, Ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Kynurensäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **23**. S. 92 (1897). — Vgl. auch *W. J. Gies*, A note on the excretion of Kynuric acid. Amer. Journ. of Physiol. Vol. **5**. p. 191 (1901). — *L. B. Mendel* and *E. C. Schneider*, On the excretion of Kynuric acid. Amer. Journ. of Physiol. Vol. **5**. p. 427 (1901). — *L. B. Mendel* and *Jackson*, Amer. Journ. of Physiol. Vol. **2**. p. 1 (1898). — *R. E. Swain*, Some notable constituents of the urine of the coyotte. Amer. Journ. of Physiol. Vol. **13**. p. 30 (1905).

[5]) Nach den Erfahrungen von *E. Abderhalden*, *E. S. London* und *L. Pincussohn* (Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **62**. S. 139 [1909]) ist die Methode von *Jaffé* der von *Capaldi* vorzuziehen.

## Säuren unbekannter Konstitution.

Hierher gehören die Oxyproteinsäure, Alloxyproteinsäure, Antoxyproteinsäure; ferner die Uroprotsäure von *Cloetta*, die Uroferrinsäure von *Thiele* und die Säure von *Hári*.

### Oxyproteinsäure, Alloxyproteinsäure, Antoxyproteinsäure.

Ihre Darstellung beruht darauf, daß die Alloxyproteinsäure durch Bleiessig gefällt wird und aus dem Filtrate die Oxyproteinsäure aus neutraler, die Antoxyproteinsäure aus essigsaurer Lösung durch essigsaures Quecksilberoxyd abgeschieden werden.

Die Darstellung erfolgt nach *St. Bondzynski*, *St. Dombrowski* und *K. Panek*.[1])

Oxyproteinsäure, $C_{43}H_{82}N_{14}O_{31}$.

Der Harn wird direkt im Vakuum eingedickt. Das lästige Schäumen wird dabei leicht verhindert, wenn man den Harn vorher mit einer geringen Menge Alkohol versetzt, die Destillation unter fortdauerndem Zufließen der zu destillierenden Flüssigkeit verlaufen läßt und dabei Sorge trägt, daß der Destillierkolben nicht zu viel Flüssigkeit enthalte. Den erhaltenen dünnen Sirup versetzt man hierauf bis zum Auftreten einer schwachen Blaufärbung an mit Kongorot gefärbten Papierstreifen mit verdünnter Schwefelsäure und darauf mit $1^1/_2$ Volumen Alkohol; von ausgeschiedenen Alkalisulfaten wird abfiltriert, die alkoholische Lösung mit Wasser verdünnt und mit Barytwasser gefällt, der Barytüberschuß gleich darauf mit Kohlensäure zur Ausfällung gebracht und die Flüssigkeit dann von dem gesamten Barytniederschlag filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum bis zur Sirupkonsistenz gebracht und nach dem Entfernen eines großen Teiles des Natriumchlorids durch Auskristallisieren in der Kälte mit konzentriertem Alkohol gefällt. Der erhaltene Niederschlag von Bariumsalzen wird nach dem Trocknen im Exsikkator in Wasser gelöst und die Lösung mit Bleiessig gefällt. Der Bleiniederschlag enthält die Körper der Alloxyproteinsäuregruppe und wird zur Darstellung derselben verwendet, das Filtrat dient zur Darstellung der Antoxyproteinsäure, vor allem aber der mit Quecksilberacetat beim Neutralisieren fällbaren Verbindung, der Oxyproteinsäure. Zu dem Zwecke muß aus dem Filtrat vorerst nicht nur das Blei, sondern auch die Essigsäure entfernt werden. Das Blei wird mit Natriumkarbonat ausgefällt; die Essigsäure kann nur durch Äther entzogen werden; dies geschieht so, daß das Filtrat von Bleikarbonat mit Essigsäure neutralisiert, eingeengt und nach

---

[1]) *St. Bondzynski, St. Dombrowski* und *K. Panek*, Über die Gruppe von stickstoff- und schwefelhaltigen organischen Säuren, welche im normalen Menschenharn enthalten sind. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 83 (1905). — Vgl. auch *St. Bondzynski* und *R. Gottlieb*, Über einen bisher unbekannten normalen Harnbestandteil, die Oxyproteinsäure. Zentralbl. f. med. Wissensch. Bd. **35**. S. 577 (1897). — *G. Töpfer*, Zur Kenntnis des unter dem Namen „Oxyproteinsäure" beschriebenen Harnbestandteiles. Ebenda. Bd. **35**. S. 705 (1897). — *St. Bondzynski* und *K. Panek*, Über die Alloxyproteinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **35**. S. 2959 (1902).

dem Entfernen der Alkalimetalle und Verjagen des Alkohols im *Schwarz*schen Apparate mit Äther extrahiert wird. Das mit Äther ausgezogene essigsäurefreie Gemisch wird in Bariumsalze umgewandelt, welche mittelst der Fällung mit Alkohol schließlich in trockenem Zustand erhalten werden. Dieses Präparat von Bariumsalzen, das frei von Natriumacetat ist, dient nun zur Fällung mit Quecksilberacetat; seine wässerige Lösung wird mit Essigsäure leicht angesäuert und mit einer 20%igen Lösung von Quecksilberacetat versetzt. Es entsteht eine reichliche Fällung. Noch reichlicher war die durch Neutralisieren des Filtrates erzeugte Fällung; es wird nun abwechselnd bald die Quecksilberacetatlösung, bald eine Sodalösung so lange zugesetzt, wie ein weißer Niederschlag noch ausfällt; mit dem Erscheinen eines gelben Niederschlages wird die Fällung unterbrochen. Dieser Niederschlag besteht nun zum größten Teil aus dem Quecksilbersalz der Oxyproteinsäure. Schon die letzte Fraktion des bei saurer Reaktion ausgefallenen Quecksilberniederschlages erweist sich als aus mehr oder weniger reinem Quecksilbersalz der Oxyproteinsäure bestehend. Von den letzten Spuren der Antoxyproteinsäure lassen sich die Salze der Oxyproteinsäure durch Umfällen mit Quecksilberacetat befreien, indem die ersten Fraktionen jeder Fällung verworfen werden und der Prozeß so lange wiederholt wird, bis die Präparate keine Diazoreaktion mehr geben. Das schließlich reine Quecksilbersalz wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die freie Säure mit Äther ausgezogen und dann in Ba- und Ag-Salz umgewandelt.

Die Säure gibt keine Xanthoprotein-, keine Biuretprobe; schwache Chamoisfärbung mit Millon. Gibt nicht die Diazoreaktion, keine Fällung mit Phosphorwolframsäure. Ihre Alkalisalze sind in Wasser zerfließlich, auch in Alkohol nicht schwer löslich. Ca- und Ba-Salz ebenfalls zerfließlich im Wasser, ist aber schwer löslich in Alkohol, wenn auch leichter als die entsprechenden Salze der Antoxyproteinsäure.

Antoxyproteinsäure.

Der Harn wird so vorbereitet: Nach der Entfernung der Phosphorsäure mit Kalk, der Schwefelsäure mit Barythydrat und dem Ausfällen des Ca- und Barytüberschusses mit $CO_2$ wird der Harn bis zur Konsistenz eines dünnen Sirups im Vakuum bei 55° eingeengt, durch abwechselndes Einengen und Erkaltenlassen und dabei erfolgender Kristallisation von einem großen Teil der NaCl sowie teilweise vom Harnstoff befreit und dann mit einem Alkohol-Äthergemisch (2:1) mehreremal ausgezogen; der in Alkoholäther unlösliche Rückstand wird nun in Wasser gelöst und behufs Entfernung der Alloxyproteinsäuregruppe mit Bleiessig gefällt.

Zu dem Filtrat des Bleiniederschlages wird nach dem Entfernen von Blei mit Natriumkarbonat, dem Neutralisieren der alkalischen Flüssigkeit mit Essigsäure, dem Einengen und schwachen Ansäuern mit Essigsäure eine 20%ige Lösung von Quecksilberacetat zugesetzt, und zwar so lange, wie sie noch eine Fällung erzeugt. Dieser bei saurer Reaktion ausgefallene Quecksilberniederschlag wird abgenutscht, bis zum Verschwinden der Chlorreaktion im Filtrat mit Wasser ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Quecksilbersulfit nach dem Verjagen des Schwefelwasserstoffs noch einmal mit Quecksilberacetat in saurer

Lösung versetzt, der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die schwefelwasserstofffreie Lösung der Säure mittelst Bariumhydrat gebunden und nach Ausfällen des Barytüberschusses mit Kohlensäure sowie Konzentration der Flüssigkeit in vacuo bis zur Konsistenz eines Sirups durch Eingießen in konzentrierten Alkohol als Bariumsalz gefällt, durch wiederholtes Auflösen in Wasser und Umfällen in Alkohol gereinigt und im Vakuumexsikkator getrocknet, oder es wird das Silbersalz dargestellt. Zu diesem Zwecke wird das Bariumsalz in der Lösung mittelst Natriumsulfat in das Natriumsalz übergeführt (unter Vermeidung des geringsten Überschusses von Natriumsulfat), dann wird eine zur Ausfällung des Chlors eben genügende Menge Silbernitrat hinzugefügt; die Lösung vom ausgeschiedenen Chlorsilber filtriert, das Filtrat mit einem berechneten Überschuß von Silbernitrat und darauf mit Alkohol im Verhältnis 1:1 versetzt. Das Silbersalz fällt als weißer flockiger Niederschlag, der mit 50%igem, dann mit 97%igem Alkohol gewaschen, von Alkohol mit Äther befreit und im Vakuumexsikkator getrocknet wird. Noch vorteilhafter erwies es sich, aus dem nach obiger Methode dargestellten Bariumsalz durch partielles Zerlegen mit einer zur vollständigen Ausfällung von Barium ungenügenden Menge verdünnter Schwefelsäure, Eindampfen der Lösung in vacuo bis zur Konsistenz eines Sirups, Ausziehen der freien Säure mit absolutem Alkohol und Binden derselben an Baryt ein Präparat des Bariumsalzes der Antoxyproteinsäure darzustellen, das mit alloxyproteinsaurem Barium nicht verunreinigt war.

Die Antoxyproteinsäure wird in konzentrierten Lösungen von Phosphorwolframsäure gefällt; die Fällung ist im Überschuß des Fällungsmittels und in Wasser löslich. Die Kalium- und Natriumsalze sind in Wasser sehr leicht löslich, die Ca- und Ba-Salze ebenfalls sehr leicht löslich, in absolutem Alkohol ist das Bariumsalz sehr schwer, das Ca-Salz etwas leichter löslich. Das Silbersalz ist in Alkohol unlöslich. Ist schwefelhaltig. Der Schwefel wird beim Kochen mit Alkalien abgespalten. Ist optisch aktiv, dreht die Ebene des polarisierten Lichtes ziemlich stark nach rechts. Gibt keine Biuret-, keine *Millon*sche Reaktion, hingegen die *Ehrlich*sche Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure.

Alloxyproteinsäure.

Als Ausgangsprodukt dienen die Bleiniederschläge, die bei der Gewinnung der Antoxyproteinsäure sowie der Oxyproteinsäure von dem diese Säuren enthaltenden Filtrate getrennt werden. Zur Entfernung der Säuren der Oxyproteinsäuregruppe wird mittelst Oxalsäure der Bleiniederschlag fraktioniert zerlegt. Die Oxalsäure zerlegt in dem Gemische der betreffenden Säuren zuerst die Bleisalze der Säuren der Oxyproteinsäuregruppe. Der Bleiniederschlag wird nach dem Auswaschen mit wenig Wasser (mit einem Rührwerk) in zwei nacheinander folgenden Operationen anfangs mit einer sehr verdünnten Lösung von Oxalsäure, schließlich mit einem Überschuß dieser Säure unter stetem Umrühren zerlegt. Die bei den Zerlegungsprozessen erhaltenen Filtrate werden durch Binden der freien Säure mittelst Kalkhydrat, Entfernen des Kalküberschusses mittelst Kohlensäure, Einengen bei gelinder Wärme in vacuo und Fällen mit Alkohol auf Calciumsalz der Alloxyproteinsäure verarbeitet. Die zweiten Fraktionen enthalten nach einer

Umfällung mit Alkohol und Ausziehen mit Alkohol nur Calciumsalze von mit Bleiessig fällbaren Verbindungen. Durch Zerlegen mit Oxalsäure, Filtrieren von oxalsaurem Calcium, Ausfällen des Oxalsäureüberschusses mit Barythydrat, Entfernen des Barytüberschusses mit Kohlensäure und Fällen des eingeengten Filtrates mit konzentriertem Alkohol wird das Calciumsalz in Bariumsalz umgewandelt.

Die alloxyproteinsauren Salze unterscheiden sich von den oxy- und antoxyproteinsauren Salzen durch ihre geringere Löslichkeit in Alkohol.

Die Säure ist schwefelhaltig.

Die freie Alloxyproteinsäure ist sowohl in Wasser, wie in konzentriertem Alkohol leicht löslich und wird aus der Lösung in Alkohol auch mit Äther nicht gefällt.

Gibt die *Ehrlich*sche Diazoreaktion nicht.

Zur quantitativen Bestimmung der Oxyproteinsäurefraktion verfuhr *W. Ginsberg*[1]) wie folgt:

1000 *cm*³ Harn (dessen Gesamt-N vorher nach *Kjeldahl* bestimmt wird) wird mit heißgesättigter Bariumhydroxydlösung in Überschuß gefällt, durch Kohlensäure von Barytüberschuß befreit, ein aliquoter Teil heiß filtriert und auf dem Wasserbade bis zum dünnen Sirup eingedampft und dieser nach dem Prinzip von *Mörner-Sjöqvist* mit Ätheralkohol (1:2) erschöpft. Dies wird dadurch erreicht, daß der Sirup, mit der zwanzigfachen Volummenge Ätheralkohol versetzt und gut durchgeschüttelt, 24 Stunden in verschlossenem Gefäß stehen bleibt, dann die Flüssigkeit von dem abgesetzten Niederschlag oder Sirup abgegossen, der Rückstand mehrmals (eventuell auf dem Filter) mit Ätheralkohol gewaschen und dann in Wasser gelöst wird. In dieser Fraktion sind Harnstoff, Harnsäure, Ammoniak, Kreatin, Kreatinin, Hippursäure nicht vorhanden (beim Hundeharn ist möglicherweise noch Allantoin vorhanden), sondern anscheinend nur die Bariumsalze der drei Oxyproteinsäuren und ein derzeit noch unbekannter stickstoffhaltiger Rest. Die Gesamtheit der Oxyproteinsäuren wird durch Quecksilberacetat unter Sodazusatz ausgefällt und ihr Stickstoffgehalt nach *Kjeldahl* bestimmt.

Zur quantitativen Bestimmung von Proteinsäuren im Blute wurde von *J. Browinski* folgendes Verfahren eingeschlagen.[2]) 1 *l* Serum wurde nach der 5fachen Verdünnung mit Wasser vom Eiweiß mittelst Ansäuern mit Essigsäure, Kochen und Filtrieren befreit. Nachdem diese Flüssigkeit unter vermindertem Druck auf 400 *cm*³ eingedampft worden war, wurde in

[1]) *W. Ginsberg,* Über die Mengenverhältnisse und die physiologische Bedeutung der Oxyproteinfraktion des Harnes. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **10**. S. 411 (1907). — Vgl. ferner das Verfahren von *Witold Gawinski,* Quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung von Proteinsäuren im Harn von gesunden Menschen sowie in einigen Krankheitsfällen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58. S. 454 (1909).

[2]) *J. Browinski,* Über die Gegenwart von Proteinsäuren im Blute. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58. S. 134 (1908/9). — Siehe auch die Arbeit von *H. Liebermann,* Über die Gruppe von N- und S-haltigen organischen Säuren, welche im normalen Menschenharn enthalten sind. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **52**. S. 129 (1907). — Über Uroprotsäure vgl. *Cloetta,* Über die Uroprotsäure, einem neuen Bestandteil des Harnes. Arch. f. exper. Pharm. u. Path. Bd. **40**. S. 29 (1898).

100 $cm^3$ der N bestimmt, aus 300 $cm^3$ die Proteinsäure isoliert. Zu diesem Zwecke wurde der Flüssigkeit Quecksilberacetat und Natriumkarbonat bis zum Gelbwerden des Niederschlages zugesetzt, nach genauem Waschen die Hg-Salze des Niederschlages in Bariumsalze umgewandelt. Die Lösung dieser wurde im Vakuum bis auf einige Kubikzentimeter konzentriert, mit einem vielfachen Volumen einer Alkohol-Äthermischung (2:1) versetzt. Die ausgefällten Bariumsalze wurden nach dem Auswaschen mit absolutem Alkohol in Wasser gelegt und ihr N nach *Kjeldahl* bestimmt. Außerdem kann in einem Teil des eiweißfreien Filtrates eine N-Bestimmung im Hg-Acetat-Niederschlag ausgeführt werden. Daneben wurden die Proteinsäuren auch so bestimmt, daß das enteiweißte Filtrat nach dem Einengen im Vakuum mit Schwefelsäure bis zu schwach saurer Reaktion (gegen Kongo), dann mit dem zweifachen Volumen Alkohol versetzt, das Filtrat mit Wasser verdünnt und die freien Proteinsäuren in die Bariumsalze überführt, die Lösung auf einige Kubikzentimeter eingeengt, die nach Fällung mit der Alkohol-Äthermischung gewonnenen Bariumsalze zur Bestimmung des N benutzt wurden.

Zur Darstellung der Uroferrinsäure von *Thiele*[1]) wird der Harn bei 40° zum Sirup konzentriert, mit $1^1/_3$ Volumen 90%igem Alkohol geschüttelt, filtriert, eingeengt und neutral nach Absättigung mit Ammonsulfat mit Eisenammonalaun gefällt. Der in verdünnter Schwefelsäure in der Kälte gelöste Niederschlag wird mit Ammoniak ebenfalls in der Kälte gefällt, vom Eisen filtriert und mit alkoholischer Schwefelsäure aufgenommen. Nach Entfernung der Schwefelsäure und des Alkohols wird mit Essigsäure versetzt, die Lösung in sehr viel absoluten Alkohol eingetragen, die enstandene Fällung in absoluten Methylalkohol aufgenommen und mit absolutem Äther gefällt.

Bei der Darstellung der Säure von *Hári*[2]) werden 10—20 *l* frischer Harn (ohne vorherige Ansäuerung) mit einer 10%igen Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag mit Ätzbaryt zersetzt und aus dem in Lösung gegangenen Anteil Baryt durch $CO_2$ entfernt. (Die Entfernung des Baryts muß möglichst sofort erfolgen.) Das Filtrat wird auf dem Wasserbad zu einem eben feuchten kristallinischen Brei eingedampft, der braune Rückstand mit 96%igem Alkohol zunächst einige Stunden digeriert, dann heiß extrahiert, schließlich der alkoholische Extrakt stark eingeengt. Von den nach dem Erkalten sich ausscheidenden Kristallmassen (hauptsächlich Kreatinin) wird abfiltriert, die alkoholische Lösung mit überschüssigem Äther versetzt. Aus der dabei entstehenden gelblich-weißen Emulsion scheidet sich nach wenigen Minuten eine dickflüssige, gelbbraune Schichte ab, die in wenig Wasser gelöst eine intensiv alkalisch reagierende Flüssigkeit darstellt. Diese Flüssigkeit mit einer Lösung von Zink, Silber oder Cadmium versetzt, gibt einen voluminösen Niederschlag, über Schwefelsäure, dann bei 98—99° getrocknet, gelbe oder braune Schollen, die zu einem gelben Pulver zerreiblich sind.

## Phenole.

1. Phenol, $C_6H_5OH$. Kristallisiert in Nadeln, schmilzt bei 42°, siedet bei 180°, löslich in Wasser, Alkohol, Äther.

Zu seinem Nachweis dienen folgende Reaktionen: 1. Bei Zusatz von Eisenchlorid blauviolette Färbung. 2. Beim Kochen mit *Millon*schem[3]) Reagens dunkelrote Färbung.

---

[1]) *O. Thiele,* Über Uroferrinsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37. S. 251 (1902/3).

[2]) *P. Hári,* Über einen neuen stickstoffhaltigen Bestandteil des normalen Menschenharnes. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46. S. 1 (1905).

[3]) *Millons* Reagens wird dargestellt, indem man Quecksilber in dem doppelten Gewicht Salpetersäure von 1·42 spez. Gew. zunächst in der Kälte, dann beim mäßigen

eventuell roter Niederschlag. 3. Bei Zusatz von Bromwasser entsteht zuerst ein gelatinöser Niederschlag (Brom- resp. Dibromphenol), bei weiterem Zusatz ein gelblichweißer kristallinischer Niederschlag von Tribromphenol.

Die Isolierung aus dem Harn, in welchem die Phenole als gepaarte Verbindungen vorhanden sind, erfolgt in der Weise [1]), daß man größere Mengen Harn (mindestens 200 *cm*³) mit 50 *cm*³ rauchender Salzsäure versetzt, destilliert, bis das Destillat mit Bromwasser keine Trübung mehr gibt. Das Destillat, das außer Phenolen noch Indol, flüchtige Säuren usw. enthält, wird mit Alkali stark übersättigt, nochmals destilliert; dabei gehen Ammoniak, Indol, Skatol über. Die zurückgebliebene erkaltete Flüssigkeit sättigt man mit Kohlensäure, um die Phenole aus ihren Natriumverbindungen frei zu machen, destilliert, bis das Destillat keine Reaktionen auf Phenol zeigt. Man kann auch das in der Kälte mit kohlensaurem Natrium gesättigte Destillat mit Äther ausschütteln, den abgetrennten Äther bei gewöhnlicher Temperatur verdunsten lassen.

2. Kresol, $C_6H_4 . CH_3 . OH$, o- und namentlich p-Kresol bilden den Hauptbestandteil der Phenole im Harn.

Das o-Kresol schmilzt bei 31—31·5°, siedet bei 185—186°; das p-Kresol schmilzt bei 36°, siedet bei 199°, ist wenig löslich in Wasser.

Nachweis wie beim Phenol. Parakresol gibt mit Eisenchlorid eine schmutzig graublaue Färbung.

Die Trennung des Parakreosols vom Phenol und o-Kresol nach *Baumann* [2]) beruht darauf, daß das Bariumsalz der Parakresolsulfosäure mit überschüssigem Baryt eine in Barytwasser unlösliche Verbindung gibt, während die Bariumsalze der Phenolsulfosäure und der Kresolsulfosäure durch Barytwasser nicht gefällt werden. Die nach dem obigen Verfahren erhaltenen Destillate werden mit überschüssigem Alkali versetzt, eingedampft, dann angesäuert und mit Äther mehrmals ausgeschüttelt. Man verdunstet die abgetrennte Ätherlösung, trocknet den Rückstand mit Chlorcalcium und destilliert. (Der größte Teil des Phenolgemenges geht bei 196—202° über, ganz am Schlusse steigt das Thermometer auf über 230°.) Das Destillat wird mit dem gleichen Gewicht konzentrierter Schwefelsäure eine Stunde auf dem Wasserbade erwärmt, mit Wasser verdünnt, mit Baryt neutralisiert und filtriert, das Filtrat bis nahe zur Kristallisation eingedampft und mit überschüssigem, konzentriertem Barytwasser versetzt. Nach zwölfstündigem Stehen wird das abgeschiedene basische p-kresolsulfosaure Barium abfiltriert, das Filtrat durch Kohlensäure von überschüssigem Baryt befreit, filtriert, auf ein kleines Volumen eingedampft, wieder mit konzentriertem Barytwasser (der Rest des noch in Lösung enthaltenen p-kresolsulfosauren Ba) gefällt und nach 12 Stunden abfiltriert. Durch das Filtrat leitet man $CO_2$, filtriert,

Erwärmen löst, das doppelte Volumen Wasser zufügt und nach mehrstündigem Stehen die klare Flüssigkeit abgießt.

[1]) *H. Thierfelder*, Handbuch der chemischen Analyse. 8. Aufl. S. 266 (1909).

[2]) *E. Baumann*, Über die Ätherschwefelsäuren der Phenole. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2. S. 336 (1878/9). — Derselbe, Über den Nachweis und Darstellung von Phenolen und Oxysäuren aus dem Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 6. S. 183 (1882).

verdampft zur Trockene und wägt den Rückstand, der das phenolsulfosaure und das o-kresolsulfosaure Barium enthält. Die Niederschläge werden in Wasser zerteilt und mit $CO_2$ behandelt. Das Filtrat wird verdunstet, getrocknet und gewogen.

Zum Nachweis des o-Kresols löst man nach *Thierfelder*[1]) die Kalischmelze des Phenolgemisches in Wasser, säuert mit Schwefelsäure an, schüttelt mit Äther aus und extrahiert den Verdampfungsrückstand des Ätherauszuges mit Chloroform. In dieses geht die aus dem o-Kresol entstandene Salicylsäure über und läßt sich durch Violettfärbung der wässerigen, durch Destillation von Phenol befreiten Lösung mittelst Eisenchlorid nachweisen.

Ein bequemes Verfahren zum Nachweis von Phenol im Harn besteht nach *Salkowski* darin, daß man den Harn im Reagenzglas mit etwas Salpetersäure zum Sieden erhitzt: es tritt bittermandelartiger Geruch nach Orthonitrophenol auf; nach völligem Erkalten fügt man Bromwasser hinzu. Es entsteht ein Niederschlag von Nitrotribromphenol. Normaler Harn zeigt höchstens eine leichte Trübung. Eine zweite Probe macht man nach dem Erhitzen mit Salpetersäure mit Natronlauge alkalisch: orangerote Färbung durch das Nitrophenolnatrium.

Bei der Darstellung der Phenolschwefelsäuren als Kaliumsalz nach *Baumann* verdunstet man 8—10 *l* Harn von Hunden, denen man täglich mehrere Gramm Phenol gegeben hat, zum Sirup, extrahiert den Rückstand mit 96⁰/₀igem Alkohol, fällt die abfiltrierte Lösung in der Kälte mit einer Lösung von Oxalsäure in Alkohol vollständig aus, filtriert nach 10 Minuten und setzt Kalilauge bis zur schwach alkalischen Reaktion hinzu. Dann wird wieder filtriert, die Flüssigkeit zum Sirup verdunstet und der Sirup in der Kälte stehen gelassen. Die ausgeschiedenen Kristalle werden abgesaugt und aus siedendem Alkohol umkristallisiert. Das so erhaltene phenolschwefelsaure Kalium ist rein.

Ein Gemisch von Phenol- und Parakresolschwefelsäure erhält man, wenn Pferdeharn (50—100 *l*) zum Sirup eingeengt, mit 90⁰/₀igem Alkohol aufgenommen wird. Der wieder zum dünnen Sirup verdunstete Auszug wird mehrere Tage lang einer möglichst niederen Temperatur ausgesetzt. Die Flüssigkeit erstarrt zu einem Kristallbrei; das Gemisch wird wiederholt aus Alkohol umkristallisiert.[2])

Die quantitative Bestimmung des Phenols und Kresols erfolgt nach *Kossler* und *Penny*[3]) mit der Modifikation von *C. Neuberg*. Es wird dabei das Phenol durch Hypojodid in Trijodphenol, das Kresol in Trijodkresol übergeführt und jodometrisch bestimmt.

500 *cm*³ Harn werden bei schwach alkalischer Reaktion auf etwa 100 *cm*³ eingedampft, wobei das Aceton (auch $NH_3$) entweicht, der konzentrierte

---

[1]) *Thierfelder*, l. c. S. 267. — *J. Munk*, Zur vergleichenden Chemie des Säugetierharnes. Arch. f. Anat. u. Phys. Suppl.-Bd. **(1880)** 27.

[2]) *C. Preusse*, Über das Vorkommen isomerer Kresolschwefelsäuren im Pferdeharn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **2**. S. 355 (1878). — *E. Baumann* und *C. Preusse*, Zur Kenntnis der Oxydationen und Synthesen im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **3**. S. 156 (1879). — *Schmiedeberg*, Über Oxydationen und Synthesen im Tierkörper. Arch. f. exper. Pharm. Bd. **14**. S. 305 (1881).

[3]) *A. Kossler* und *E. Penny*, Über die maßanalytische Bestimmung der Phenole im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **17**. S. 117 (1893). — *C. Neuberg*, Über die quantitative Bestimmung des Phenols im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **27**. S. 123 (1899).

Harn in einen Destillationskolben übergeführt, mit soviel $H_2SO_4$ versetzt, daß die Flüssigkeit ungefähr 5% der ursprünglichen Harnmenge davon enthält, und destilliert. Wenn der Kolbeninhalt so weit abdestilliert ist, daß die Flüssigkeit heftig zu stoßen beginnt, verdünnt man mit Wasser, destilliert weiter und wiederholt dies mindestens 5—6mal. Die Vorlagen können während der Destillation offen sein, ohne daß Phenol verloren geht. Das Destillat wird zur Bindung von Ameisensäure und salpetriger Säure mit Calciumkarbonat ordentlich durchgeschüttelt (bis die saure Reaktion verschwunden ist), abermals destilliert und die Destillation nach Zufügen von Wasser zum Rückstande mehrmals wiederholt. Um die bei der Destillation aus den Kohlehydraten des Harns entstehenden jodbildenden Körper abzutrennen, werden die Destillate in einem großen 2 *l*-Kolben vereinigt, mit einer Auflösung von 1 *g* Ätznatron und 6 *g* Bleizucker zersetzt und etwa 15 Minuten auf lebhaft siedendem Wasserbade erhitzt. Hierbei löst sich ein Teil des Bleioxyds in den Phenolen zu basischen Bleiphenolaten, während die leicht flüchtigen Aldehyde entweichen. Zur vollständigen Entfernung der letzteren erhitzt man den Kolbeninhalt noch kurze Zeit am absteigenden Kühler auf freiem Feuer, bis wenige Kubikzentimeter des Destillates ammoniakalische Silberlösung nicht mehr reduzieren (was gewöhnlich nach 5 Minuten der Fall ist); längeres Erhitzen ist zu vermeiden. Die Phenole bleiben als basische Bleiphenolate zurück, während die anderen jodbindenden Substanzen entweichen. Man säuert nun den Kolbeninhalt stark mit verdünnter Schwefelsäure an und destilliert die Phenole unter zweimaliger Ergänzung des Wassers ab. Ein aliquoter Teil des gemessenen Destillates wird in einer gut schließenden Stöpselflasche aus einer Bürette mit nitritfreier $^1/_{10}$ n-Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt, durch Eintauchen in heißes Wasser auf 60° erwärmt, dann $^1/_{10}$ n-Jodlösung, und zwar 15—20 *cm*³ mehr als man $^1/_{10}$ n-Natronlauge genommen, zugefügt und verschlossen geschüttelt. Nach dem Erkalten wird angesäuert und das Jod mit $^1/_{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung zurücktitriert.

1 *cm*³ $^1/_{10}$ n-Jodlösung entspricht 1·567 *mg* Phenol oder 1·8018 *mg* Kresol.

Da nach den Untersuchungen von *W. Mooser*[1]) die Verwendung von Schwefelsäure und die Destillation über Calciumkarbonat, wie in der ursprünglichen Vorschrift angegeben, nachteilig sind, schlägt er folgende Modifikation des Verfahrens vor. Eine abgewogene, schwach alkalisch gemachte Harnmenge (200—250 *g*) wird auf dem Wasserbad auf ca. $^1/_5$ eingedampft, in den Destillationskolben gespült und dieser mit dem Kühler verbunden. Durch den Hahntrichter läßt man so viel sirupöse Phosphorsäure langsam hinzufließen, daß deren Menge ca. 5% des ursprünglichen Harnvolumens ausmacht. Unter guter Kühlung wird dann bis auf ca. 100 *cm*³ abdestilliert und die Destillation nach jeweiligem Nachgießen von 50 *cm*³

---

[1]) *W. Mooser*, Beitrag zur Kenntnis der aromatischen Körper des Harns. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **63**. S. 155 (1903).

Wasser so lange wiederholt, bis das Destillat keine *Millon*sche Reaktion mehr zeigt. Die in einem geräumigen Kolben aufgefangenen Destillate werden nach Übersättigung mit kohlensaurem Kalk unter Einleiten eines reinen Kohlensäurestromes einer erneuten Destillation unterworfen und diese, wie angegeben, wiederholt. Die übergehende Flüssigkeit wird am besten in einem *Schott*schen Literkolben mit eingeschliffenem Stopfen aufgefangen und nach *Kossler* und *Penny* titriert.

3. Brenzkatechin, $C_6H_4(OH)_2$ 1, 2. Kristallisiert aus Wasser und Äther in Prismen, aus Benzol in Tafeln. Schmilzt bei 104°, siedet ohne Zersetzung bei 245·5°. Sublimiert in glänzenden, rechtwinkeligen Plättchen. Ist in Wasser, Alkohol, Äther, kaltem Benzol leicht löslich. Die wässerige Lösung wird mit Bleiacetat gefällt. Mit Eisenchlorid färbt es sich grün. Alkalische Kupferlösung und ammoniakalische Silberlösung werden reduziert. Die wässerige Lösung färbt sich bei Gegenwart von Alkalien oder kohlensauren Alkalien grün, grünbraun bis schwarz.

Zum Nachweis des Brenzkatechins wird nach *Thierfelder*[1]) der mit HCl angesäuerte Harn der Destillation unterworfen, bis keine flüchtigen Phenole mehr entweichen; man schüttelt die zurückgebliebene Flüssigkeit mit Äther aus, und den Ätherauszug mit verdünnter Sodalösung. Der Äther wird verdunstet, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und die filtrierte wässerige Lösung auf Brenzkatechin geprüft.

Zur Darstellung des Brenzkatechins wird nach *Baumann* der Harn stark mit Salzsäure angesäuert, eine halbe Stunde auf dem siedenden Wasserbade digeriert und nach dem Erkalten mehrmals mit Äther extrahiert. Die Ätherlösungen schüttelt man zur Entfernung der Säuren (Salzsäure und organische Säuren) wiederholt mit verdünnter Sodalösung, so lange diese sich noch färbt, destilliert den Äther ab, versetzt den Rückstand mit zirka 20 $cm^3$ gesättigter Lösung von Kochsalz und Natriumsulfat, um Phenol und Kresol abzuscheiden (diese bleiben größtenteils ungelöst zurück), filtriert die Salzlösungen, die Brenzkatechin und Hydrochinon enthalten können, und destilliert die mit Wasser verdünnte Lösung, um Phenol und Kresol ganz zu entfernen. Nach dem Erkalten wird mit Äther extrahiert. Beim Verdunsten der Ätherauszüge bleiben Brenzkatechin und Hydrochinon als Sirup zurück, der kristallinisch erstarrt, wenn nicht sehr wenig Hydrochinon sich darin befindet. Man löst den Rückstand in Wasser und fällt das Brenzkatechin aus der Lösung mittelst Bleiacetat unter Vermeidung eines Überschusses. Hydrochinon bleibt in Lösung. Der Bleiniederschlag wird in Wasser verteilt, mit Schwefelsäure zerlegt und mit Äther geschüttelt. Aus der ätherischen Lösung bleibt beim Abdunsten das Brenzkatechin in kaum gefärbten Prismen zurück. Die vom Bleiniederschlag abfiltrierte Flüssigkeit wird angesäuert mit Äther extrahiert. Aus der ätherischen Lösung bleibt beim Verdunsten das Hydrochinon als gelber bis brauner Rückstand zurück, der bald kristallinisch erstarrt. Die Kristalle werden durch Umkristallisieren aus heißem Benzol oder Toluol gereinigt. Man kann Brenzkatechin und Hydrochinon auch trennen, durch Ausziehen der trockenen Substanz mit kaltem Benzol, das Brenzkatechin geht in Lösung, das Hydrochinon bleibt zurück.

[1]) *Thierfelder*, l. c. S. 268.

Zum Nachweis der Phenole in den Fäzes werden diese zu einem dünnen Brei verrieben, destilliert, bis etwa ein Drittel des Volumens übergegangen ist; das Destillat übersättigt man mit Natronlauge, destilliert wieder den dritten Teil über; der Rückstand wird mit Schwefelsäure übersättigt und die Phenole abdestilliert.[1])

## Inosit.

Inosit, $C_6H_6(OH)_6$, Hexaoxyhexahydrobenzol, kristallisiert mit 2 Molekülen Wasser in farblosen, großen, rhomboedrischen Kristallen. Schmilzt bei 225°, ist in Wasser leicht (1 : 75), in Alkohol, Äther unlöslich. Wird durch basisches Bleiacetat gefällt.

Zum Nachweis dienen folgende Reaktionen.

*Scherers* Probe. Eine kleine Menge Inosit wird mit $HNO_3$ auf dem Platinblech bis zur Trockene verdunstet und zum Rückstand etwas $NH_3$ und ein Tropfen $CaCl_2$ hinzugefügt, vorsichtig zur Trockene eingedampft, gibt schöne, rosenrote Färbung (Rhodizonsaurer Kalk). Nach *Boedeker* ist der Zusatz von $NH_3$ überflüssig und schädlich.

*Seidels* Probe. Dampft man Inosit mit überschüssiger Salpetersäure zur Trockene ein, löst den Rückstand in wenig Wasser und fügt wenig Strontiumacetat hinzu, so färbt sich die Flüssigkeit violett.

Bei Isolierung des Inosits aus Gewebsflüssigkeiten und Harn verfährt man nach *Boedeker* und *Cooper Lane*[2]) wie folgt.

Der Harn wird, nach Entfernung von eventuell vorhandenem Eiweiß, mit Bleizuckerlösung, ohne Überschuß, oder mit Barytwasser vollständig ausgefällt, filtriert, und das erwärmte Filtrat möglichst genau mit soviel Bleiessig versetzt, als noch ein Niederschlag entsteht. Zweckmäßig ist es, den Harn vor der Fällung auf $^1/_4$ auf dem Wasserbade zu konzentrieren. Der entstandene, nach 12 Stunden gesammelte Bleiessigniederschlag wird nach dem Auswaschen in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Von der nach einiger Zeit ausfallenden Harnsäure filtriert man ab, konzentriert das Filtrat möglichst stark und versetzt es kochend mit dem 3—4fachen Volumen Alkohol. Entsteht hierbei ein starker, am Boden des Glases haftender Niederschlag, so gießt man die heiße, alkoholische Lösung einfach ab; entsteht eine flockige, nicht klebende Fällung, so filtriert man die heiße Lösung durch einen erhitzten Trichter und läßt erkalten. Haben sich nach 24 Stunden Gruppen von Inositkristallen abgesetzt, so filtriert man ab und wäscht die Kristalle mit wenig kaltem Alkohol. In diesem Falle ist es ratsam, um keinen Verlust an Inosit zu erleiden, den auf Zusatz von heißem Alkohol erhaltenen Niederschlag in wenig kochendem Wasser zu lösen und wieder mit dem 3—4fachen Volumen Alkohol zu fällen. Haben sich keine Inositkristalle ausgeschieden, so versetzt man das klare alkoholische Filtrat nach und nach mit Äther, bis beim Durchschütteln eine milchige Trübung entsteht, und läßt in der Kälte 24 Stunden stehen. Hat man nicht zu wenig Äther angewendet (ein Überschuß schadet nicht), so scheidet sich der vorhandene Inosit in perlglänzenden Plättchen aus.

[1]) Vgl. *Thierfelder,* l. c. S. 738.

[2]) *Boedeker* und *Cooper Lane,* Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. **117**. S. 118 (1861); nach *Neubauer-Vogel-Huppert,* 10. Aufl. S. 175.

Bei der Untersuchung ganzer Tiere auf Inosit verfuhr *Rosenberger*[1]) wie folgt: Das gewogene Tier wurde getötet, sofort grob zerstückelt und in die dreifache Gewichtsmenge vorher vorbereiteten, siedenden Wassers geworfen und dieses im Sieden erhalten. Nach 20—25 Minuten löst man das Fleisch von den Knochen, zertrümmert letztere im Mörser und schickt die Weichteile durch eine Hackmaschine. Die etwas abgekühlte Kochbrühe wird auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und mit Ätzkali bis zu 2—5% versetzt. Die Organe gibt man nun in einen geräumigen Kolben, spült mit der Brühe nach, erhitzt sie in derselben rückfließend zunächst im Wasserbad, dann, wenn das Schäumen aufgehört hat, im Paraffinbad bis zur Lösung. Die Brühe (die nicht ganz klar zu sein braucht) wird dann in eine größere Schale gegossen, mit Salpetersäure neutralisiert und dann so viel konzentrierte $HNO_3$ (spez. Gew. 1·5) zugesetzt, daß ihr Gehalt 2·5 Volumprozent freier Säure entspricht. Nun wird die unterdessen oft grau und grobflockig gewordene Flüssigkeit womöglich zunächst auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbad auf $^1/_3$ der ursprünglich verwendeten Wassermenge unter häufigem Rühren eingedampft. Man neutralisiert sie mit heißgesättigter Barytlauge und fügt dann noch einen Überschuß von dieser hinzu. Die Farbe der Lösung wird dabei rot bis graurot (vorher gelb).

Bei basischer Reaktion erhitzt man 10—15 Minuten lang, dann wird wieder mit $HNO_3$ schwach angesäuert, auf ein möglichst kleines Volumen (eventuell bis zum Sirup) eingedampft und nachher 7—8 Volumprozent der augenblicklichen Flüssigkeitsmenge konzentrierter $HNO_3$ in der Hitze schußweise unter starkem Rühren zugegeben. Dieses abwechselnde Zugeben von Säure und Alkali wird je nach der Menge und der Widerstandsfähigkeit des Ausgangsmaterials mehrmals wiederholt. Sammelt sich ein pulveriger Niederschlag, untermischt mit Kristallen, am Boden der Schale an, so wird die Flüssigkeit bei ganz schwachsaurer Reaktion auf eine geringe Menge eingedampft. Man läßt erkalten, nutscht von dem Niederschlag ab, wäscht diesen in der Reibschale gründlich aus und vereinigt Waschwasser und ursprüngliche Lösung. Das Filtrat und Waschwasser werden mit Bleizuckerlösung gefällt; es empfiehlt sich, gut absetzen zu lassen, dann abzunutschen und in der Reibschale den Niederschlag sorgfältig mit verdünnter Bleizuckerlösung auszuwaschen, da dieser leicht Inosit zurückhält. Das Filtrat und das Waschwasser von der Bleizuckerfällung werden nun in der Wärme mit Bleiessig ausgefällt, unter Zugabe von etwas Ammoniak 12—24 Stunden stehen gelassen, von dem Niederschlag abgenutscht und dieser mit $H_2S$ gespalten. Man soll ihn nicht auswaschen, da er leicht zersetzlich ist, sondern das Filtrat vom Schwefelblei eindampfen und, wenn es nicht mehr stark gefärbt ist, nochmals mit Bleiessig fällen, oder bei Gegenwart von mehr Verunreinigungen auf den Sirup wieder $HNO_3$ und Barytwasser einwirken lassen. Die Flüssigkeit kann auch mit Vorteil durch Einleiten von Chlor gereinigt und zum Kristallisieren gebracht werden. Die Methode von *Rosenberger* eignet sich auch für Untersuchungen von Blut, Milch, Aszitesflüssigkeit und Eiter. Für den Urin fällt die Behandlung mit Ätzkali weg; das abwechselnde Erhitzen mit $HNO_3$ und Barytwasser ist auch beim Harn zur Isolierung kleinster Mengen von Inosit sehr vorteilhaft.

Inositreaktionen gelingen meist nur an reinen Substanzen. Zur Reinigung eignet sich gut die Fällung des schon ziemlich reinen Inosits mittelst Ätzbaryt in methylalkoholischer Lösung. Der Niederschlag ist leicht löslich in Wasser, der Baryt läßt sich in der Wärme durch Kohlensäure von Inosit trennen.

## Hippursäure.

Hippursäure. $C_7H_5O . CH_2NH . COOH$, Benzoylglykokoll, bildet rhombische Prismen. Schmilzt bei 187°. Beim Kochen mit Säuren, Laugen oder beim längeren Erhitzen auf 170—180° zerfällt sie in Benzoesäure und Glykokoll. Ist wenig löslich (1:600)

---

[1]) *Fr. Rosenberger*, Ein Verfahren zum Nachweis von Inosit in tierischen Geweben und Flüssigkeiten. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56. S. 373 (1908). — Vgl. auch: *E. Starkenstein*, Zeitschr. f. exper. Path. u. Therapie. Bd. 5. S. 378 (1908) und Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58. S. 162 (1909).

in kaltem, leicht in heißem Wasser, sehr leicht löslich in Alkohol und in Essigäther, unlöslich in Benzol und Petroläther. Charakteristisch ist das hellbraune hippursaure Eisenoxyd. Über dem Schmelzpunkt erhitzt, schmilzt sie zu einer öligen Flüssigkeit und zersetzt sich beim weiteren Erhitzen unter Bildung von Benzoesäure, Blausäure und Benzonitril.

Zum Nachweis dient außer den erwähnten Eigenschaften die *Lücke*sche Reaktion. Kocht man Hippursäure (wie auch Benzoesäure) mit etwas starker Salpetersäure in einer Porzellanschale stark ein, so tritt beim stärkeren Erhitzen Geruch nach Bittermandelöl durch das entstandene Nitrobenzol auf. Zur Erkennung kleiner Mengen von Hippursäure ist nach *Spiro*[1]) die Laktimidprobe zu empfehlen. Ein Molekül möglichst reiner Hippursäure wird in drei Molekülen Essigsäureanhydrid gelöst, dann wird ein Molekül geschmolzenes essigsaures Natrium hinzugegeben. Setzt man ein Molekül Benzaldehyd hinzu und erwärmt eine halbe Stunde auf dem Wasserbade, so färbt sich die Flüssigkeit gelblich bis dunkelgelb und erstarrt beim Abkühlen zu einem Kristallbrei von gelblichen Nadeln: Das Laktimid der Benzoylaminozimtsäure. Mit Wasser gewaschen, aus heißem Alkohol und Benzol umkristallisiert. Schmelzpunkt: 165—166°.

Zur Isolierung der Hippursäure nach *Bunge* und *Schmiedeberg*[2]) aus Menschenharn. Man macht den Harn (von Menschenharn mindestens 300 $cm^3$) mit kohlensaurem Natrium alkalisch, dampft das Filtrat bis fast zur Trockene und nimmt den Rückstand mit absolutem Alkohol wiederholt auf. Der Rückstand nach dem Verdampfen des Alkohols wird in Wasser gelöst, die Lösung des hippursauren Natriums mit Schwefelsäure oder Salzsäure angesäuert, wenn nötig filtriert und mit Essigäther erschöpft. Der abgehobene Essigäther wird im Scheidetrichter mit Wasser ausgeschüttelt, der Essigäther vorsichtig bei einer 50° nicht übersteigenden Temperatur abdestilliert und der Rückstand zur Entfernung von Benzoesäure und anderer Verunreinigungen mehreremal mit Petroläther behandelt. Der Rückstand wird nun in wenig warmem Wasser gelöst, mit etwas Tierkohle entfärbt, filtriert und der Kristallisation überlassen.[3])

Will man gleichzeitig die Benzoesäure bestimmen, so löst man den Petrolätherrückstand in warmem Wasser, filtriert, verdunstet das Filtrat bei mäßiger Temperatur, trocknet den Rückstand und wägt. *Jaresveld* und *Stokris*[4]) verwandeln den mit Petroläther gereinigten Essigätherauszug durch $\frac{1}{4}$–$\frac{1}{2}$stündiges Kochen mit 10—20 $cm^3$ starker NaOH in Benzoesäure um, säuern nach der Abkühlung mit HCl an, schütteln mehrmals mit Petroläther, bestimmen nach freiwilligem Verdunsten des Petroläthers die darin gelöste Benzoesäure durch Trocknen und Wägen und berechnen durch Multiplikation mit 1·468 daraus die Hippursäure. Bei eventuell gleichzeitig

[1]) *C. Spiro,* Über Nachweis und Vorkommen des Glykokolls. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **28**. S. 174 (1899).

[2]) *G. Bunge* und *O. Schmiedeberg,* Über die Bildung der Hippursäure. Arch. f. exper. Pharm. Bd. **6**. S. 233 (1877). — *Schmiedeberg,* Über Spaltungen und Synthesen im Tierkörper. Arch. f. exp. Pharm. Bd. **14**. S. 379 (1881).

[3]) Über ein Verfahren zur Bestimmung der Hippursäure von *Th. Pfeiffer, C. Bloch, R. Riecke* siehe Mitt. d. Landw. Inst. d. Univ. Breslau. Bd. **2**. S. 273 und Zeitschr. f. anal. Chem. Bd. **42**. S. 470 (1903).

[4]) *G. J. Jaresveld* und *B. J. Stokvis,* Über den Einfluß der Nierenaffektionen auf die Bildung von Hippursäure. Arch. f. exp. Pharm. Bd. **10**. S. 269, 271 (1879).

vorhandener Milchsäure erfolgt die Trennung beider Körper über dem Zinksalz. Die sirupöse Flüssigkeit wird mit Wasser verdünnt, mit Zinkoxyd auf dem Wasserbad digeriert, die filtrierte Lösung fast zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit Alkohol aufgenommen und filtriert. Das Hippursäurezink geht in Lösung. Die alkoholische Lösung wird verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Salzsäure versetzt, mit Essigäther ausgeschüttelt.

Einfach gestaltet sich die Darstellung aus frischem Pferdeharn. Man kocht den Harn einige Minuten mit überschüssiger Kalkmilch; aus der warm filtrierten, konzentrierten und dann abgekühlten Flüssigkeit fällt man die Hippursäure durch Zusatz von überschüssiger Salzsäure. Die stark gepreßten Kristalle löst man in Kalkmilch unter Aufkochen und fällt die Hippursäure zum zweiten Male aus dem stark konzentrierten Filtrate mit Salzsäure. Die Kristalle werden durch Umkristallisieren gereinigt.[1]) Oder besser ist es nach *Salkowski* den mit Kalkmilch behandelten und filtrierten Harn nach dem Eindampfen mit Alkohol zu fällen, filtrieren, den Alkoholauszug verdunsten, nach völligem Erkalten mit HCl stark ansäuern. Die Hippursäure scheidet sich als kristallinischer Brei aus.[2])

Eine einfache Bestimmung der Hippursäure im Harn geben neuerdings *Henriques* und *Sörensen*[3]) an. 50 $cm^3$ Harn werden mit Salzsäure angesäuert, sechsmal mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Dann wird der Essigäther abdestilliert, der Rückstand mit konzentrierter Szlzsäure 1½ Stunden gekocht, wobei die gesamte Hippursäure in Benzoesäure und Glykokoll gespalten wird.

Die Stickstoffmenge des Glykokolls wird nach Neutralisation durch Formoltitrierung (vgl. S. 816) bestimmt.

Eine schnelle Ausscheidung von Hippursäure erfolgt, wenn nach *Herbert E. Roaf*[4]) der Urin vor der Ansäuerung mit Ammoniumsulfat versetzt wird. Am besten ist es, auf je 1 *l* Harn 250 *g* $(NH_4)_2SO_4$ oder das gleiche Volumen gesättigter Lösung und 15 $cm^3$ 98%iger $H_2SO_4$ anzuwenden. Nach 24stündigem Stehen erfolgt die Kristallisation.

Zur Bestimmung der Benzoesäure und der Hippursäure ist das Verfahren von *W. Wiechowski*[5]) zu empfehlen. Dieses wird wie folgt ausgeführt.

Der (stets sauer reagierende) Harn wird mit Natriumkarbonat eben deutlich alkalisch gemacht, auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft, mit Alkohol in einen Meßkolben von geeigneter Größe gespült,

---

[1]) Bezüglich der Entfernung des beigemengten Farbstoffes vgl. *Curtius*, Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. **26**. S. 145 (1882); ferner *Neubauer-Vogel-Huppert*. 10. Aufl. S. 225.

[2]) *Salkowski*, Praktikum. S. 172.

[3]) *V. Henriques* und *S. P. L. Sörensen*, Über die quantitative Bestimmung der Aminosäuren etc. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **63**. S. 27 (1909).

[4]) *Herbert E. Roaf*, A rapid method for separating hippuric acid from urine. Biochem. Journ. Bd. **3**. S. 185 (1908). — Zur Bestimmung der Hippursäure vgl. auch *Cates*, Chem. News. Vol. **83**. p. 121.

[5]) *W. Wiechowski*, Die Gesetze der Hippursäuresynthese. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **7**. S. 262 (1906).

Alkohol bis fast zur Marke nachgegossen und 24 Stunden stehen gelassen, hierauf bis zur Marke aufgefüllt, durchgeschüttelt, rasch filtriert und von dem Filtrate zwei Portionen mit Pipetten in Stöpselflaschen von entsprechendem Inhalt abgefüllt. Der Alkohol dieser Extraktteile wird auf dem Wasserbade unter Zuhilfenahme eines Luftstromes, der über den Flüssigkeitsspiegel gesaugt oder geblasen wird, entfernt und der Rückstand in möglichst wenig Wasser (meist 5 $cm^3$) gelöst.

Wird die Gesamtbenzoesäure bestimmt, so wird die wässerige Lösung unter Zusatz von starker Lauge mehrere Stunden unter Rückfluß gekocht (I); wird die Benzoesäure und Hippursäure getrennt bestimmt, so wird mit Salzsäure angesäuert und zunächst die freie Benzoesäure fünfmal mit je 20 $cm^3$ Petroleumäther (Siedetemperatur 30—60°) ausgeschüttelt. Die einzelnen Petrolätherportionen werden mittelst eines am unteren Ende ausgebogenen Heberchens, welches nebst einem Mundstück (nach Art einer Spritzflasche) in einen passenden Korkstopfen montiert ist, durch ein trockenes Filter in einen Schütteltrichter abgelassen. Dann wird das Petrolätherextrakt fünfmal mit Barythydratlösung ausgeschüttelt, wobei meist eine flockige Ausscheidung erfolgt, die Barytportionen in einen Hartglaskolben filtriert, Filter und Schütteltrichter nachgewaschen (II). Das hierbei ausfallende Bariumkarbonat stört in keiner Weise.

Die nach der Benzoesäureausschüttelung in der Extraktionsflasche zurückgebliebene, von ausgeschiedener Hippursäure mehr oder minder trübe Flüssigkeit wird hierauf fünfmal mit Essigäther ausgeschüttelt und die Extrakte mittelst des Hebers in eine Porzellanschale abgelassen. Hierbei gilt als Regel, das erstemal solange und mit soviel Essigäther zu schütteln, daß die ganze ausgeschiedene Hippursäure gelöst und die wässerige Schicht klar geworden ist. Leichte Trübungen der Ätherschichte lassen sich stets durch wenige Tropfen Alkohol beseitigen. Die vereinigten Extrakte werden an einem warmen Orte (30°) der Selbstverdunstung überlassen, die Rückstände mit starker Lauge in einen Hartglaskolben gespült und wie I verseift (III). — Dieser Teil der Bestimmung geht rasch vonstatten, die drei Ausschüttelungen beanspruchen kaum mehr Zeit als eine Stunde. Das Abdunsten des Essigäthers dauert dagegen meist 12 Stunden. — Es resultieren schließlich drei Benzoesäurelösungen: I. Gesamtbenzoesäure, II. freie Benzoesäure, III. gebundene Benzoesäure. Sie werden mit Phosphorsäure angesäuert und der Dampfstromdestillation unterworfen, indem 2 *l* Wasser unter normalem Drucke durchdestilliert werden. Das Destillat tropft durch ein Filterchen in eine entsprechende Menge Natriumkarbonatlösung. Nachdem die (alkalisch reagierenden) Destillate in Schalen bis fast zur Trockene eingedampft worden sind, wird abermals in Extraktionsflaschen gespült und in derselben Weise wie früher dreimal mit Petroläther ausgezogen, die Extrakte in gewogene Kölbchen filtriert, der Petroläther durch einen (durch Schwefelsäure) getrockneten Luftstrom bei Zimmertemperatur entfernt und die zurückbleibende tadellos weiße Benzoesäure gewogen. Die an der Wage abgelesenen Werte werden

schließlich unter Vernachlässigung des Volumens der alkoholunlöslichen Harnbestandteile auf die Gesamtharnmenge umgerechnet.

Man kann das Verfahren mit Umgehung der Dampfstromdestillation ausführen. Dabei muß man aber die verseiften Proben I und III zunächst nach Ansäuern mit $H_2SO_4$ und Wiederalkalischmachen mit Karbonat mit Alkohol von den vielen Salzen befreien. Diese Extraktion geht rasch vonstatten, wenn man das Auswaschen der Salze auf dem Saugfilter vornimmt.

Bei Bestimmung der Hippursäure neben freier Benzoesäure verfährt *R. Cohn*[1]) wie folgt:

Der frische Urin wird in einer Schale zur Trockene verdampft, dreimal mit größeren Mengen kochendem Alkohol extrahiert; die vereinigten alkoholischen Extrakte werden nach dem Klären abgegossen, eventuell der letzte Rest filtriert. Der Rückstand nach dem Verjagen des Alkohols wird in möglichst wenig Wasser gelöst, in einen Schütteltrichter gegossen, mit möglichst wenig Wasser nachgespült, abgekühlt, mit konzentrierter Salzsäure stark angesäuert, hierauf mit großen Portionen Äther viermal ausgeschüttelt. In den Äther geht die gesamte freie Benzoesäure und ein Teil der Hippursäure über, während meistens ein Teil der ausgeschiedenen Hippursäure in dem Äther suspendiert mit ihm zusammen von der salzsauren wässerigen Lösung abgetrennt wird. Hierauf wird der Äther nach dem Absetzen der mitgerissenen Hippursäure abfiltriert, der letzte Rest noch mit frischem Äther nachgespült und der Äther in dem die abgeschiedene Hippursäure enthaltenden Erlenmeyerkolben vollständig abdestilliert, der trockene Rückstand viermal mit großen Mengen Petroläther (Siedepunkt 30—60°) am Rückflußkühler ausgekocht. Der Petroläther enthält die freie Benzoesäure. Hierauf werden sämtliche Hippursäurefraktionen vereinigt, der Äther aus der salzsauren Lösung durch Erwärmen verjagt, mit der mindestens dreifachen Menge konzentrierter Salzsäure versetzt und 5 Stunden am Rückflußkühler auf dem Sandbade zur Spaltung der Hippursäure gekocht. Nach dem Abkühlen wird die Lösung viermal mit Äther ausgeschüttelt. Der Äther enthält die gebundene Benzoesäure. Durch Abdestillieren des Äthers wie des Petroläthers im gewogenen Becherglase und Trocknen im Becherglase erhält man die freie wie gebundene Benzoesäure.

Zur Bestimmung von Hippur- und Benzoesäure bei Anwesenheit von Benzoylglukuronsäure schlägt *A. Magnus-Levy*[2]) folgendes Verfahren vor:

[1]) *R. Cohn,* Über den Glykokollvorrat des tierischen Organismus. Festschr. f. *Jaffé* Braunschweig 1901. S. 327; vgl. auch *H. Wiener,* Über das Glykokoll als intermediäres Stoffwechselprodukt. Arch. f. exp. Pharm. Bd. **40**. S. 313 (1898); vgl. ferner die Arbeiten von: *A. van de Velde* und *B. J. Stokvis,* Experimenteller Beitrag zur Frage der Hippursäurezersetzung im lebenden Organismus. Arch. f. exper. Pharm. Bd. **17**. S. 189 (1883). — *Schröder,* Über die Bildung der Hippursäure im Organismus des Schafes. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **3**. S. 325 (1879). — *W. Salomon,* Über die Art der Hippursäurebildung beim Pflanzenfresser. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **3**. S. 371 (1879). — *Fr. Kronecker,* Über die Hippursäurebildung beim Menschen in Krankheiten. Arch. f. exp. Path. Bd. **16**. S. 344 (1883).

[2]) *A. Magnus-Levy,* Über Neubildung von Glykokoll. Biochem. Zeitschr. Bd. **6**. S. 534 (1907).

Größere Mengen (200—500 $cm^3$) von Harn werden mit Mononatriumphosphat ganz schwach angesäuert, auf dem Wasserbade (eventuell unter weiterer Zugabe dieses Salzes, wenn die Reaktion wieder ins Alkalische umschlägt) auf $^1/_3$ bis $^1/_5$ eingedampft. Zum erkalteten Urin werden einige Kubikzentimeter 20%iger $H_2SO_4$ zugegeben. Nach 24 Stunden wird die abgeschiedene Hippursäure und Benzoesäure (a) auf einer kleinen Nutsche abgesaugt. Der Niederschlag wird 5—10mal mit ganz kleinen Mengen eiskalten Wassers gedeckt, das Waschwasser jedesmal erst nach 1—2 Minuten langer Berührung mit dem Niederschlag abgesaugt, bis derselbe kein Chlor und keine Schwefelsäure mehr enthält. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und weiter behandelt (b).

Der Niederschlag a wird im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und gewogen. Dann wird er im Soxhletapparat mit Petroläther vollständig erschöpft, der Petroläther in einer Porzellanschale freiwillig verdampft, der Rückstand mit wenig Petroläther oder Äther in ein kleines, zum Wägen geeignetes Gefäß gespült. Nach dem freiwilligen Verdampfen und 24stündigem Stehen im $H_2SO_4$-Exsikkator (kein Vakuum!) wird die freie Benzoesäure gewogen (a-Benzoesäure). Die Hippursäure ergibt sich aus der Differenz.

Die schwefelsauren Filtrate und Waschwässer (b) vom Niederschlag (a) werden durch Eintragung von feingepulvertem Ammonsulfat nahezu gesättigt; die amorphen, stark gefärbten Niederschläge werden abfiltriert, mit konzentrierter Ammonsulfatlösung nachgewaschen. Das ca. 200—400 $cm^3$ betragende Filtrat wird in einem Ätherextraktionsapparat erschöpft, was 2—3×8 Stunden erfordert. Der Rückstand vom freiwillig verdunsteten Äther wird in Normallauge gelöst, im Schütteltrichter mit $H_2SO_4$ versetzt und mit Petroläther die freie Benzoesäure extrahiert. Die Hippursäure (b), die in dem wässerigen Rückstand geblieben ist, wird durch Kochen mit starker KOH zerlegt, die frei gewordene Benzoesäure nach dem Ansäuern mit Petroläther gelöst, gewogen und auf Hippursäure (b) umgerechnet. Bei dem gewöhnlichen Verfahren, wo nicht erst die Abtrennung der Hauptmenge durch Säurefällung erfolgt, kann ein Teil der „gebundenen Benzoesäure“ aus Benzoyl-Glukuronsäure stammen. (Diese an sich in Äther unlöslich, geht bei gleichzeitiger Anwesenheit von viel Hippursäure und Benzoesäure in großen Mengen in den Äther.)

## Homogentisinsäure.

Die Homogentisinsäure, 2,5-Dioxyphenylessigsäure, $C_8H_8O_4$, findet sich im Harn bei der Alkaptonurie. Kristallisiert mit einem Molekül Wasser in Prismen. Ist leicht löslich in Wasser, Alkohol, Äther, fast unlöslich in Chloroform, Benzol, Toluol, Petroläther. Schmilzt bei 146·5—147°. Sublimiert scheinbar unverändert; das Sublimat färbt sich allmählich schön blau. Die wässerige Lösung färbt sich dunkel, besonders schnell bei Gegenwart von Ammoniak, Natronlauge. Reduziert neutrale oder ammoniakalische Silberlösung, wie auch alkalische Kupferlösung schon in der Kälte. Mit *Millons* Reagenz in der Kälte ein zitronengelber, allmählich orange-farbiger Niederschlag; beim Erwärmen wird der Niederschlag gleich hell ziegelrot. Mit Eisenchlorid vorübergehende Blaufärbung. Das Bleisalz $(C_8H_7O_4)_2Pb + 3H_2O$ kristallisiert in Nadeln und in Prismen; schmilzt bei 214—215°. Unlöslich in Alkohol und in Äther; schwer löslich in Wasser (in 675 Teilen). — Das Lakton der Homogentisinsäure entsteht beim Erhitzen über 100°, schmilzt bei 191°; kristallisiert in kurzen Prismen. In kaltem Wasser wenig, in heißem Wasser ziemlich leicht löslich. Gibt mit *Millon*schem Reagenz Rotfärbung. Die wässerige Lösung reduziert neutrale Silberlösung nicht, erst auf Ammoniakzusatz.

Der Alkaptonharn wird an der Luft, besonders nach Alkalizusatz, dunkel, reduziert *Fehling*sche Lösung in der Kälte, wie auch neutrale und ammoniakalische Silberlösung, gibt mit Eisenchlorid eine blaue Färbung, mit *Millons* Reagenz einen zitronengelben, beim Erwärmen ziegelroten Niederschlag.

Zur Darstellung der Homogentisinsäure benutzt *E. Meyer*[1]) den Äthylester der Säure. Der nach Zusatz von $H_2SO_4$ eingedampfte Harn

[1]) *E. Meyer,* Über Alkaptonurie. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. **70**. S. 443 (1901).

wird mit Äther, dem etwas Alkohol zugesetzt ist, 3—4mal ausgeschüttelt, der Äther abdestilliert, der Rückstand mit Alkohol versetzt und in die Lösung HCl-Gas eingeleitet. Die saure, mit Wasser stark verdünnte Flüssigkeit wird nach dem Neutralisieren mit Soda mit Äther ausgeschüttelt; der Ätherrückstand kristallisiert. Man bringt die Kristallmasse auf einen Tonteller und kristallisiert unter Zusatz von etwas Tierkohle aus Wasser um. Schmelzpunkt des Esters 119—120°.

Nach *Schumm*[1]) werden 200 *cm*³ Urin mit 30 *cm*³ 25°/₀iger HCl auf dem Wasserbade auf 25—30 *cm*³ eingedampft, der Rückstand wird mit 90—100 *cm*³ Alkohol in einen Erlenmeyerkolben übergespült, mit 10 *cm*³ rauchender HCl versetzt und der Kolben auf ein lebhaft kochendes Wasserbad gesteckt. Der Kolben wird, um die Verdunstung des Alkohols zu beschränken, mit einem Glas- oder Porzellanschälchen bedeckt. Nach einstündigem Erhitzen wird der Kolbeninhalt mit ca. 300 *cm*³ Wasser verdünnt, mit Soda schwach alkalisiert und sogleich dreimal mit Portionen von je ca. 80 *cm*³ Äther ausgeschüttelt. Der größte Teil des Äthers wird abdestilliert, der Rückstand auf dem Wasserbade erhitzt, bis der Rest des Äthers und des Alkohols verjagt sind. Der sirupöse Rückstand verwandelt sich nach einiger Zeit in einen Kristallbrei. Reinigung des Esters durch Umkristallisieren aus Wasser.

Nach einer älteren Methode von *Wolkow* und *Baumann*[2]) säuert man den Harn mit Schwefelsäure an (75 *cm*³ 1:12 verdünnte Schwefelsäure auf 1 *l* Harn), dampft auf dem Wasserbade bis auf den zehnten Teil ein, extrahiert vier- bis fünfmal mit dem dreifachen Volumen Äther. Die Ätherauszüge werden abdestilliert, der Sirup in der 30—60fachen Menge Wasser gelöst, die Lösung filtriert, bis nahe zum Sieden erhitzt, mit 30 *cm*³ einer konzentrierten Lösung von Bleiessig versetzt und heiß filtriert. Beim Erkalten kristallisiert das Bleisalz in großen prismatischen Kristallen aus.

Nach *Garrod*[3]) wird der Harn nahe zum Kochen erhitzt, je 100 *cm*³ mit wenigstens 5—6 *g* Bleiacetat versetzt, sobald es sich gelöst hat, der entstandene Niederschlag filtriert und das Filtrat 24 Stunden am kühlen Orte zur Kristallisation stehen gelassen. Es kristallisiert das Bleisalz der Homogentisinsäure in großen prismatischen Kristallen aus. Das im Wasser kaum lösliche Bleisalz wird fein verrieben, in Wasser zerteilt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat erst auf dem Wasserbade und dann im Vakuum zum Sirup verdunstet.

---

[1]) *Schumm*, Beiträge zur Kenntnis der Alkaptonurie. Münch. med. Wochenschr. Bd. **51**. S. 1599 (1904).

[2]) *Wolkow* und *Baumann*, Über das Wesen der Alkaptonurie. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **15**. S. 228 (1891).

[3]) *Arch. E. Garrod*, Alkaptonuria; a simple method for the extraction of homogentisinic acid from the urine. Journ. of Physiol. Vol. **23**. p. 512 (1898/9). — *H. V. Ogden*, Ein Fall von Alkaptonurie. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **20**. S. 280 (1895). — *A. Garrod* und *W. H. Hurtley*, On the estimation of homogentisic acid in urine by the method of *Wolkow* and *Baumann*. Journ. of Physiol. Vol. **33**. p. 206 (1905/6). — Vgl. ferner die Arbeiten: *H. Embden*, Zur Kenntnis der Alkaptonurie. Beiträge zur Kenntnis der Alkap-

Die Bestimmung der Homogentisinsäure erfolgt nach der Vorschrift von *E. Baumann*[1]: 10 *cm*³ filtrierter Alkaptonharn werden in einem Kölbchen mit 10 *cm*³ Ammoniak von 3% (besser 8%) versetzt. Zu dieser Mischung läßt man sofort einige Kubikzentimeter $^1/_{10}$ n-Silberlösung hinzufließen, schüttelt einmal um und läßt 5 Minuten stehen. Alsdann werden der Mischung 5 Tropfen 10%ige Calciumchloridlösung und 10 Tropfen Ammoniumkarbonat hinzugefügt; nach dem Umschütteln wird filtriert. Die bräunlich gefärbte, aber immer ganz klare Lösung wird mit Silbernitrat geprüft: tritt dabei sofort wieder eine starke Abscheidung von Silber ein, so wird bei dem zweiten Versuch gleich eine größere Menge (doppelt bis dreifache) $^1/_{10}$ n-Silberlösung zu der Mischung von 10 *cm*³ Harn und 10 *cm*³ Ammoniak hinzugefügt. Kennt man schon annähernd die erforderliche Menge Silberlösung, so bedient man sich, um die Endreaktion zu erkennen, nur noch der Salzsäure. Die Endreaktion ist erreicht, wenn das Filtrat vom Silberniederschlag beim Ansäuern mit verdünnter Salzsäure, wobei ein zu großer Überschuß zu vermeiden ist, eine eben noch sichtbare Trübung von Chlorsilber liefert. Das tiefbraune alkalische Filtrat nimmt auf Zusatz von Salzsäure eine lichtrote Färbung an, sobald man der Endreaktion nahe gekommen ist *(Embden)*. Sind mehr als 8 *cm*³ $^1/_{10}$ n-Silberlösung auf 10 *cm*³ Harn und 10 *cm*³ Ammoniak erforderlich, so sind bei Wiederholung des Versuches statt 10 *cm*³ Ammoniak 20 *cm*² zu verwenden. Für den normalen Harn sind nach *Mörner* wegen der Fällung der Harnsäure durch ammoniakalische Silberlösung auf 10 *cm*³ von der verbrauchten Silberlösung 0·3 *cm*³ abzuziehen. 1 *g* wasserfreie Homogentisinsäure reduziert unter den angegebenen Bedingungen 240—245 *cm*³ $^1/_{10}$ n-Ag-Lösung. 1 *cm*³ Ag-Lösung sind = 0·004124 *g* Homogentisinsäure.

Nach *Denigès*[2]) verfährt man so:

10 *cm*³ des filtrierten Urins werden mit 10 *cm*³ $NH_3$ und 20 *cm*³ $^1/_{10}$ n-$AgNO_3$-Lösung versetzt und 5 Minuten stehen gelassen. Nach beendeter Reduktion fügt man zur Erleichterung des Filtrierens 5 Tropfen einer 10%igen $CaCl_2$-Lösung und darauf $^1/_2$ *cm*³ $(NH_4)_2CO_3$- oder $Na_2CO_3$-Lösung hinzu (um das reduzierte Silber in einem Niederschlag von $CaCO_3$ zu vereinigen), füllt das ganze auf 50 *cm*³ auf und filtriert. 25 *cm*³ dieses Filtrates werden nun mit 5 *cm*³ $NH_3$, 50 *cm*³ Wasser, 10 *cm*³ Cyankaliumlösung, welche auf die $^1/_{10}$ n-Silbernitratlösung eingestellt ist, und zuletzt mit 5 Tropfen Jodkaliumlösung (1 : 4) versetzt und mit $^1/_{10}$ n-$AgNO_3$-Lösung bis zu einer bleibenden Opaleszenz titriert.

---

tonurie. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **18**. S. 304 (1893). — *K. Mörner,* Zur Kenntnis des Verhaltens der Gallus- und Gerbsäure im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **16**. S. 257 (1892). — *Mittelbach,* Ein Beitrag zur Kenntnis der Alkaptonurie. Arch. f. klin. Med. Bd. **71**. S. 50 (1901).

[1]) *E. Baumann,* Über die Bestimmung der Homogentisinsäure im Alkaptonharn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **16**. S. 268 (1892).

[2]) *Denigès,* Journ. Pharm. Chim. [6.] T. **5**. p. 50; nach Chem. Zentralbl. **1897**, I. S. 338.

Die beim Zurücktitrieren verbrauchte Silbermenge entspricht der durch die Homogentisinsäure reduzierten.

Bezüglich der anderen aromatischen Oxysäuren sei nur die Isolierung der p-Oxyphenylessigsäure, $C_8H_8O_3$, und der p-Oxyphenylpropionsäure (Hydroparacumarsäure), $C_9H_{10}O_3$, nach *Baumann*[1]) erwähnt. Zum dünnen Sirup eingedampfter frischer Harn (etwa 50 *l*) wird mit Essigsäure stark angesäuert, mit Äther extrahiert (zur Trennung der Emulsion muß wiederholt Alkohol zugesetzt werden), die Ätherauszüge mit überschüssiger Sodalösung wiederholt geschüttelt, die vereinigten wässerigen alkalischen Lösungen wieder angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Der nach Abdestillieren des Äthers zurückbleibende Rückstand wird auf dem Wasserbade erwärmt, die Hauptmenge der Essigsäure so verjagt, in wenig Wasser gelöst, filtriert, wieder mit Äther versetzt, der Äther abdestilliert, das zurückbleibende braune Öl wiederholt mit wenig Wasser ausgezogen, die wässerigen Auszüge, solange ein Niederschlag entsteht, mit neutralem Bleiacetat versetzt. In dem Filtrat des Niederschlages fällt man die Oxysäuren durch basisches Bleiacetat, zerteilt den abfiltrierten, gewaschenen Niederschlag im Wasser und zersetzt ihn mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat vom Schwefelblei wird wieder mit Äther ausgeschüttelt. Nach Abdunsten des Äthers hinterbleibt ein stark saurer gelber Sirup, der meist nach einigen Tagen kristallinisch erstarrt. Beim Ausbleiben der Kristallisation ist es zweckmäßig, den Sirup in Wasser zu lösen, mit kohlensaurem Baryt zu kochen und aus der Lösung der Barytsalze die Säuren abzuscheiden. Die ausgeschiedene Kristallmasse kristallisiert man aus Wasser um. Zuerst kristallisiert die p-Oxyphenylessigsäure, die aus Benzol umkristallisiert völlig rein erhalten werden kann. Die aus der Mutterlauge gewonnene p-Oxyphenylpropionsäure (Hydroparacumarsäure) ist mit p-Oxyphenylessigsäure gemengt. Oxymandelsäure wird aus dem angesäuerten Harn mit Äther extrahiert und die wässerige Lösung des Rückstandes mit basischem Bleiacetat gefällt.

Zum Nachweis der Oxysäuren erwärmt man nach dem Ansäuern den Harn auf dem Wasserbad, um die Phenole zu entfernen, schüttelt dann mehreremal mit Äther aus, die ätherische Lösung schüttelt man dann mit einer verdünnten Sodalösung, säuert die Sodalösung mit Schwefelsäure an, schüttelt diese wieder mit Äther aus. Den Rückstand von Äther löst man in Wasser und prüft mittelst der *Millon*schen Reaktion (*Baumann*).

## Indol und Indolderivate.

### Indol, Skatol.

Beide Körper sind in den Fäzes häufig vorhanden.

---

[1]) *E. Baumann*, Über den Nachweis und die Darstellung von Phenolen und Oxysäuren aus dem Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 6. S. 191 (1881); vgl. ferner Ebenda. Bd. 4. S. 304 (1880).

Indol, $C_8H_7N$, HC—CH=C—CH=CH—NH (Strukturformel), bildet Blättchen. Schmilzt bei 52°, siedet bei 253—254° unter Zersetzung. Mit Wasserdämpfen nicht flüchtig. In Wasser, Alkohol, Äther, Chloroform, Ligroin löslich. Von den Verbindungen ist das Pikrat charakteristisch.

Zum Nachweis benutzt man folgende Reaktionen:

1. *Legal*sche Probe. Wird eine Indollösung mit frisch hergestellter Nitroprussidnatriumlösung bis zur Gelbfärbung versetzt, dann mit einigen Tropfen Natronlauge, so entsteht eine violettblaue Färbung, die nach Ansäuern mit Salzsäure oder Eisessig rein blau wird *(Salkowski)*. Empfindlichkeit: 1 : 500.000.

2. Eine mit einigen Tropfen Salpetersäure angesäuerte wässerige Lösung von Indol mit einigen Tropfen stark verdünnter (0·02%iger) Kaliumnitritlösung versetzt, gibt einen roten Niederschlag von salpetersaurem Nitrosoindol, oder es entsteht bei sehr verdünnten Indollösungen eine rote Färbung.

3. Sehr verdünnte, salpetrigsaures Salz enthaltende Indollösung färbt sich mit konzentrierter Schwefelsäure purpurrot („Cholerarotreaktion"), Empfindlichkeit: 1 : 1,000.000 *(Blumenthal)*.

4. Mit starker Salzsäure befeuchteter Fichtenspan färbt sich durch eine alkoholische Indollösung kirschrot.

5. Wird eine Indollösung mit dem halben Volumen einer 2%igen p-Dimethylaminobenzaldehyd- und darauf tropfenweise mit 25%iger Salzsäure versetzt, so tritt eine Rotfärbung auf.[1]) Bei vorsichtigem Zusatz einiger Tropfen einer 0·5%igen Natriumnitritlösung geht die Farbe in ein schönes dunkles Rot über, das ziemlich bald verschwindet.[2])

6. Ganz verdünnte Glyoxylsäurelösung und konzentrierte Schwefelsäure: Rotfärbung. Empfindlichkeit: 1 : 500.000 (*Hopkins, Dakin*[3]).

7. Eine verdünnte Indollösung nimmt nach Zusatz von Formaldehyd (4%ige Lösung) und konzentrierter Schwefelsäure violettrote Farbe an *(Kondo)*.[4])

Skatol, Pr-3-Methylindol, $C_9H_9N$, HC—CH=C—C—C.$CH_3$=CH—NH (Strukturformel), farblose Blättchen, schmilzt bei 95°, siedet bei 265—266°; von stechendem Fäkalgeruch. Löst sich in Wasser schwerer als Indol; leicht löslich in Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol. Mit Wasserdämpfen sehr leicht flüchtig. Beim Erhitzen des Pikrats mit wässerig verdünnter Natronlauge destilliert Skatol unzersetzt, während, wenn man das Indolpikrat mit Alkalilauge erhitzt, Zersetzung eintritt (*Baeyer*[5]).

Die zum Nachweis dienenden Reaktionen sind:

1. Die mit wenig Salpetersäure und etwas Kaliumnitritlösung versetzte wässerige Lösung von Skatol gibt eine weißliche Trübung, keine Rotfärbung wie Indol.

---

[1]) *P. Ehrlich*, Mediz. Woche. 1901, zit. nach *Thierfelder*, l. c. S. 294.

[2]) *F. A. Steensma*, Über Farbenreaktionen der Eiweißkörper, des Indols und des Skatols mit aromatischen Aldehyden und Nitriten. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **47**. S. 25 (1906).

[3]) *Dakin*, The glyoxylic acid reaction. Journ. biol. Chem. Bd. **2**. S. 289 (1906).

[4]) *Kondo*, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48. S. 185 (1906).

[5]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **13**. S. 2339. Vgl. *Salkowski*, Zur Kenntnis der Eiweißfäulnis. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **8**. S. 439 (1883/4).

2. Nitroprussidnatrium und Natronlauge geben in Skatollösungen intensiv gelbe Färbung; mit dem halben Volumen Eisessig einige Minuten zum Sieden erhitzt, entsteht eine violette Färbung (*Salkowski*[1]).

3. Skatol färbt einen mit Salzsäure getränkten Fichtenspan nicht. Ein mit alkoholischer Skatollösung getränkter Fichtenspan in kalte starke Salzsäure getaucht, färbt sich jedoch kirschrot, dann nach einiger Zeit dunkelviolett.

4. Löst sich in konzentrierter Salzsäure mit violetter Farbe; mit Schwefelsäure erwärmt purpurrote Färbung.

5. Behandelt man Skatol wie bei Indol angegeben mit p-Dimethylaminobenzaldehyd, so entsteht eine blauviolette Färbung[2]), die auf Zusatz von Natriumnitrit tiefblau wird (*Steensma*). Der blaue Farbstoff, der übrigens nicht immer auftritt, ist in Chloroform löslich.

6. Die Glyoxylsäurereaktion ist dieselbe wie beim Indol.[3])

7. Mit Formaldehyd und konzentrierter Schwefelsäure geben Skatollösungen gelbe oder braune Farbe (*Kondo*).

In neuerer Zeit hat *Ferd. Blumenthal*[4]) ausgedehnte Untersuchungen über den Nachweis von Indol und Skatol mittelst aromatischer Aldehyde angestellt. Er weist auf die Wichtigkeit des von *Denigès* erhobenen Befundes hin, daß die käuflichen Extraktionsmittel für Indol, Benzol, Toluol, Xylol, wenn sie nicht ganz rein sind, Substanzen enthalten, die sich mit Indol bei Gegenwart von Salzsäure verbinden, zu störenden Färbungen Veranlassung geben. Indol (1:10.000) gibt mit einer 2%igen alkoholischen Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd violettrote, bei Zusatz von 2 Tropfen einer 1%igen Natriumnitritlösung grenadinrote Farbe. Empfindlichkeit ca. 1:5 Millionen. — Skatol (1:10.000) mit einigen Tropfen 1—2%iger Lösung von Dimethylaminobenzaldehyd und 2 $cm^3$ rauchender Salzsäure (D 1·19) versetzt, gibt eine violettrote Farbe. Auf Zusatz von Nitrit nimmt die Lösung einen blauen Farbenton an, die Indollösungen werden mehr orangefarben. Infolge dieses Unterschiedes ist Skatol neben Indol noch in einer Verdünnung von 1 : 100.000 zu erkennen. Versetzt man Indol- oder Skatollösung mit einer 5%igen alkoholischen Lösung von Protokatechualdehyd oder 10%iger alkoholischer Lösung von Heliotropin und einigen Kubikzentimetern rauchender Salzsäure (spez. Gew. 1·19), so erhält man folgende Färbungen. Protokatechualdehyd. Indol (Verdünnung 1:10.000) orangerot; Zusatz von 2 Tropfen 1%iger Natriumnitritlösung etwas heller. Spektrum: Auslöschung vom Gelb an. Empfindlichkeitsgrenze 1:5 Millionen. Skatol (1 : 10.000) himbeerrot. Kein Spektrum. Zusatz von Nitrit blaurot. Empfindlichkeitsgrenze 1 : 1 Million. — Heliotropin. Indol (1 : 10.000) orangerot. Spektrum: Band vom Grün bis ins Blau reichend. Auf Zusatz von Nitrit blaßt die Farbe ab. Empfindlichkeitsgrenze 1 : 5 Millionen. Skatol (1 : 10.000) himberrot. Zusatz von Nitrit tiefblau. Spektrum: Streifen

---

[1]) *Salkowski*, Zur Kenntnis der Eiweißfäulnis. I. Über die Bildung des Indols und Skatols. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **8**. S. 448 (1883/4).

[2]) *Ad. Schmidt*, Münchener med. Wochenschr. Jg. **1903**. S. 721.

[3]) Vgl. *Hopkins*, Journ. of Phys. Vol. **27**. p. 418 (1900); Vol. **29**. p. 451 (1902).

[4]) *Ferd. Blumenthal*, Beiträge zum Nachweis und zur Entstehung aromatischer Körper im Organismus. Biochem. Zeitschr. Bd. **19**. S. 521 (1909).

in der Mitte des Rots. Empfindlichkeitsgrenze 1 : 1 Million. Außerordentlich schöne Reaktion. — p-Nitrobenzaldehyd. Man erhitzt 5 *cm*³ Indol- oder Skatollösung mit einer 10%igen alkoholischen Lösung von p-Nitrobenzaldehyd und 2 *cm*³ rauchender Salzsäure. Indol (1 : 10.000) Rotfärbung; nach dem Abkühlen Zusatz von 1—2 Tropfen 1%iger Natriumnitritlösung, prachtvolle Himbeerfärbung. Breites Band von Grün bis Blau im Amylalkoholauszug. Empfindlichkeitsgrenze 1 : 2—3 Millionen. Skatol (1 : 10.000) schmutziggrünblau; nach Zusatz von Natriumnitrit prachtvolle Blaufärbung. Amylalkoholauszug zeigt Streifen am Anfang des Grüns. Empfindlichkeitsgrenze 1 : 1 Million. Die Reaktionen mit Safrol, Zimtaldehyd und Eugenol sind weniger empfindlich. — Die besten Resultate gibt mit Fäzesdestillat die Vanillinprobe.

Zum Nachweis von Indol und Skatol in den Fäzes werden die zu einem dünnen Brei verriebenen Fäzes destilliert, bis etwa ein Drittel des Volumens übergegangen ist, das Destillat, das Phenol, Indol, Skatol und flüchtige Fettsäuren enthält, wird mit Natriumkarbonat übersättigt, wieder ein Drittel der Flüssigkeit überdestilliert, das Destillat mit Natronlauge stark alkalisch gemacht und wieder ein Drittel überdestilliert. Das Destillat wird auf Indol und Skatol geprüft. Oder man säuert das erste Destillat mit Salzsäure an und schüttelt mit Äther aus. Der Ätherauszug wird zur Entfernung von eventuell vorhandenen Phenolen und flüchtigen Säuren mit Natronlauge geschüttelt, die ätherische Lösung verdunstet, der Rückstand mit Natronlauge versetzt und im Dampfstrom destilliert. Indol und Skatol gehen in das Destillat über. Bei direktem Nachweis von Indol und Skatol werden die Fäzes (ca. 25 *g*) mit 20 *cm*³ Wasser und 1—2 *cm*³ 10%ige Natronlauge im Dampfstrom destilliert und das Destillat auf diese Körper geprüft.[1])

*Herter* und *Foster*[2]) benutzen zum Nachweis beziehungsweise zur quantitativen Bestimmung des Indols in den Fäzes seine Reaktion mit β-Naphtochinonnatriummonosulfonat. Verdünnte wässerige Lösungen (1 : 100.000), von Indol mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht, geben mit einem Tropfen einer 2%igen Lösung von β-Naphtachinonnatriummonosulfonat eine blaue oder grün-blaue Farbe. Skatol gibt diese Verbindung nicht. Enthalten die Fäzes beide Körper, so werden diese mit Kalilauge alkalisch gemacht, vorteilhaft im Dampfstrom abdestilliert (Skatol geht zuerst in das Destillat), das Destillat wird, um das Ammoniak zurückzuhalten, angesäuert, wieder destilliert, das Destillat mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht, das Reagens im Überschuß hinzugefügt und die sich in wenigen Minuten bildende Verbindung des Indols mit dem Naphtachinon abfiltriert. Das Filtrat wird nun angesäuert und das Skatol abdestilliert.

---

[1]) *Thierfelder,* Handbuch. 8. Aufl. S. 307 und 738.

[2]) *C. A. Herter* und *Louise Foster,* A method for the quantitative determination of indol. Journ. of biol. Chem. Vol. 1. p. 257 (1906) und On the separation of indol from skatol and their quantitative determination. Ebenda. Vol. 2. p. 267 (1906/7).

Indoxyl, $C_8H_7NO$:

```
         CH
   HC ⁄     C    C(OH)
   HC│     ‖C    CH
      ╲   ╱  ╲  ╱
       CH     NH
```

kommt im Harn in gepaarter Verbindung mit Schwefelsäure oder mit Glukuronsäure vor. Hellgelbe Kristalle, löslich in Wasser (mit grüner Fluoreszenz), in Alkohol, Äther, Aceton. Schmilzt bei 85°. Oxydiert an der Luft in alkalischer Lösung, wie auch auf Zusatz von Salzsäure und Eisenchlorid zu Indigo.

Indoxylschwefelsäure $C_8H_7NSO_4$

```
  ╱╲____.O.SO₂.OH
 │  │   │
 │  │   │            (Harnindikan).
  ╲╱ ╲ ╱
     NH
```

Das Kaliumsalz kristallisiert in glänzenden Tafeln oder Blättchen; leicht löslich in Wasser, schwerer löslich in Alkohol.

Zur Darstellung des indoxylschwefelsauren Kaliums aus dem Harn verfuhren *Baumann* und *Brieger*[1]) in folgender Weise. Der zum Sirup eingeengte Harn wurde mit 90%igem Alkohol extrahiert, der alkoholische Auszug in der Kälte mit alkoholischer Oxalsäurelösung ausgefällt, nach 10 Minuten der Niederschlag abfiltriert, das Filtrat wird sofort mit alkoholischer Kalilösung schwach alkalisch gemacht, filtriert, das Filtrat auf etwa die Hälfte eingedampft und mit dem gleichen Volumen Äther versetzt. Der dabei ausfallende sirupöse Niederschlag, der neben Salzen Harnstoff, Extraktivstoffe, den größten Teil des Indikans enthält, wird wiederholt mit 96%igem Alkohol extrahiert, die Auszüge mit dem gleichen Volumen Äther gefällt. Bei Wiederholung dieses Verfahrens mit den Auszügen bleibt schließlich aller Harnstoff in Lösung, während der Alkohol einen Teil der Extraktivstoffe zurückläßt. Die so gereinigte alkoholische Lösung wird mit soviel Äther versetzt, bis eine bleibende Trübung entsteht. Beim Stehen der Flüssigkeit in der Kälte scheidet sich das indoxylschwefelsaure Kali aus. Die Kristalle werden aus heißem Alkohol umkristallisiert. *Hoppe-Seyler* hat das Verfahren modifiziert, indem er den zum dünnen Sirup eingeengten Harn mit 96%igem Alkohol ausfällt, das Filtrat mit dem gleichen Volumen Äther versetzt. Die nach 24 Stunden abgegossene klare Flüssigkeit wird in der Kälte mit alkoholischer Oxalsäurelösung ausgefällt, schnell filtriert und mit einer konzentrierten Lösung von kohlensaurem Kalium schwach alkalisch gemacht. Das Filtrat wird vom Äther befreit, der Rest stets bei alkalischer Reaktion zum dicken Sirup eingedampft, der Sirup in der Kälte mit der 15—20fachen Menge absoluten Alkohol aufgenommen und in einem verschlossenen Gefäß 24 Stunden stehen gelassen. Der dabei entstehende Niederschlag wird mit 96%igem Alkohol ausgekocht und die Lösung der Kristallisation überlassen. Das Filtrat von den ausgeschiedenen Kristallen wird mit Äther gefällt, von den ausfallenden Schmieren schnell abgegossen und in der Kälte bis zur Ausscheidung weiterer Kristalle stehen gelassen.

Beim Nachweis des indoxylschwefelsauren Kaliums wird dieses mit einer Säure gespalten, das frei gewordene Indoxyl wird dann zu Indigo oxydiert.

---

[1]) *Baumann* und *Brieger*, Über Indoxylschwefelsäure, das Indican des Harns. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3. S. 254 (1879). — *G. Hoppe-Seyler*, Beiträge zur Kenntnis der Indigo bildenden Substanzen im Harn und des künstlichen Diabetes mellitus. Ebenda. Bd. 7. S. 423 (1882/3).

1. Nach *Jaffé*[1]) versetzt man 10 *cm*³, nötigenfalls enteiweißten Harn mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure, dann werden unter Umschütteln 1—2 Tropfen kaltgesättigte Chlorkalklösung, schließlich 2—3 *cm*³ Chloroform hinzugefügt. Das mit dem Finger verschlossene Reagenzglas wird öfter umgedreht (nicht Schütteln!), dabei nimmt das Chloroform das gebildete Indigo auf und färbt sich mehr oder weniger intensiv blau. Die Chloroformlösung zeigt einen scharfen Absorptionsstreifen zwischen *C* und *D*. Bei Verwendung eines Überschusses von Chlorcalcium wird der Indigo weiter zu dem farblosen Isatin oxydiert. Es empfiehlt sich daher, die Oxydation durch vorsichtigen Zusatz von Eisenchlorid auszuführen, das auf den einmal gebildeten Indigo nicht weiter einwirkt.

2. Nach *Obermayer.*[2])

Man versetzt 20 *cm*³ Harn mit 5—10 *cm*³ einer 10⁰/₀igen Bleizuckerlösung, filtriert und schüttelt das Filtrat mit dem gleichen Volumen rauchender Salzsäure, die 0·2—0·4⁰/₀ Eisenchlorid enthält (am besten frisch[3]) bereitet), tüchtig durch und wiederholt das Schütteln nach dem Zusatz von 5 *cm*³ Chloroform.

Bei Gegenwart von Jodiden gibt man nachträglich etwas Natriumthiosulfat in Wasser gelöst oder Natronlauge hinzu. Zur Entfernung des ebenfalls störenden Urobilins wird der angesäuerte Harn mit Ammonsulfat gesättigt, das so gefällte Urobilin in Essigäther aufgenommen *(Spaeth)*. Enthalten die Harne viel Phosphate, auch Acetessigsäure, Antipyrin, Salizylate, so darf kein Eisenchlorid zur Oxydation verwendet werden (*Gnesda*[4]).

3. Ein einfaches Verfahren, um Indikan im Harn nachzuweisen, besteht nach *E. Salkowski*[5]) darin, daß man ca. 8 *cm*³ Harn mit ca. 1 *cm*³ Kupfersulfatlösung (1:10), dann mit dem gleichen Volumen Salzsäure von 1·19 spez. Gew. versetzt, einige Kubikzentimeter Chloroform hinzufügt und durch gelindes Hinundherneigen mischt. Das Chloroform färbt sich blau. Ist wenig Indikan im Harn vorhanden, so empfiehlt es sich, den 24stündigen Harn einzudampfen, mit Alkohol zu extrahieren, den Alkoholauszug zu verdunsten, in wenig Wasser zu lösen und in der wässerigen Lösung mit den erwähnten Proben auf Indikan zu prüfen.

Bei der quantitativen Bestimmung nach *Obermayer, Wang*[6]),

[1]) *Jaffé, Pflügers* Arch. Bd. **3**. S. 448 (1870).

[2]) *Obermayer,* Über eine Modifikation der *Jaffé*schen Indikanprobe. Wiener klin. Wochenschr. Bd. **9**. S. 176 (1890).

[3]) *Maillard,* Über die Entstehung der Indoxylfarbstoffe und die Bestimmung des Harnindoxyls. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **41**. S. 437 (1904). — Derselbe, Sur la recherche de l'indoxyl dans les urines. Compt. rend. T. **136**. p. 1472 (1903).

[4]) *Gnesda,* Nachweis von Indoxyl in gewissen pathologischen Harnen. Compt. rend. T. **136**. p. 1406 (1903); Chem. Ztg. Bd. **27**. S. 676 (1903).

[5]) *E. Salkowski,* Zum Nachweis des Indikans im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **57**. S. 519 (1908).

[6]) *Ey. Wang,* Über die quantitative Bestimmung des Harnindikans. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **25**. S. 406 (1898). — Derselbe, Weiteres über quantitative Bestimmung des Harnindikans. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **27**. S. 135 (1899).

*Ellinger*[1]) wird das nach *Obermayer* gewonnene Indigo in Indigosulfosäure übergeführt und diese mit Permanganatlösung titrimetrisch bestimmt.

Von normalem, sauer reagierendem Harn werden 300 *cm*³ (von indikanreichem entsprechend weniger, 25—50 *cm*³) mit 25—50 *cm*³ einer 20⁰/₀igen Bleizuckerlösung allmählich versetzt, vom klaren Filtrat 250 *cm*³ in einem Scheidetrichter mit dem gleichen Volumen des frisch bereiteten Obermayerreagens zusammengebracht und 5—10 Minuten stehen gelassen; man gibt dann 30 *cm*³ Chloroform hinzu und schüttelt das Gemisch so oft mit immer erneuten Chloroformmengen aus, bis das Chloroformextrakt (man nehme reichlich Chloroform) sich farblos zeigt. Die gesammelten Chloroformlösungen schüttelt man mit reinem Wasser 2—3mal aus und reinigt die Chloroformlösung durch Schütteln mit sehr verdünnter Natronlauge (1 : 1000). Zur Beseitigung von Alkalispuren wird die Indigochloroformlösung mit reinem Wasser behandelt. Aus der durch ein trockenes Filter oder Asbest filtrierten Chloroformlösung wird das Chloroform durch Destillation entfernt, der Rückstand einige Minuten auf dem Wasserbade getrocknet und dann mit ca. 10 *cm*³ konzentrierter $H_2SO_4$ auf dem Wasserbade ca. 10 Minuten erwärmt. Nach erfolgter vollständiger Lösung des Indikans gibt man die Schwefelsäurelösung zu einer größeren Menge (ca. 100 *cm*³) Wasser vorsichtig hinzu und titriert heiß bis rein gelb, mit stark verdünnter Permanganatlösung. Die Indigoschwefelsäurelösung soll so weit verdünnt werden, daß sie schön blau, durchsichtig aussieht.

Die Permanganatlösung wird so bereitet, daß von einer konzentrierten Lösung (ca. 3 *g* pro Liter) 5 *cm*³ mit 195 *cm*³ Wasser verdünnt werden; diese Lösung wird mit reinem Indigo eingestellt. 1 *cm*³ dieser Lösung entsprechen etwa 0·00015 *g* Indigo. Zu dem gefundenen Indigowert muß ¹/₆ als Korrektur addiert werden, wegen der teilweisen Oxydation des Indigos zu Isatin.

Bei der quantitativen Bestimmung nach *Bouma*[2]) wird das im Harn vorhandene Indoxyl mit Isatinsalzsäure in Indigorot umgewandelt.

Erforderlich ist eine Isatinsalzsäurelösung, die 20 *mg* Isatin (Merck) in einem Liter konzentrierter (eisenfreier) Salzsäure enthält. Die Lösung muß jeden Monat neu hergestellt werden.

Der Harn (300 *cm*³) wird mit Bleiessig (1 Vol. auf 10 Vol. Harn) gefällt das klare Filtrat mit dem gleichen Volumen Isatinsalzsäure versetzt und eine Viertelstunde auf dem kochenden Wasserbad erhitzt. Das Gemisch

---

[1]) *A. Ellinger*, Zur Methodik der Indikanbestimmung im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38. S. 178 (1903).

[2]) *J. Bouma*, Über die Bestimmung des Harnindikans als Indigorot mit Isatinsalzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32. S. 82 (1901). — Derselbe, Über eine bisweilen vorkommende Abweichung bei der Bestimmung des Harnindikans als Indigorot mittelst Isatinsalzsäure. Deutsche med. Wochenschr. Bd. 28. S. 705 (1902). — *Salkowski*, Zur Kenntnis der Eiweißfäulnis. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8. S. 416, 448 (1883/4). — *H. P. T. Oerum*, Quantitative Indikanbestimmung mit dem *Meisling*schen Kolorimeter (vgl. Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 43. S. 138). Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45. S. 459 (1905). — *Jac. Bouma*, Nachtrag zur Methodik der Indikanbestimmung im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39. S. 356 (1903).

färbt sich dabei dunkelrot. Die abgekühlte Flüssigkeit wird mit Chloroform ausgeschüttelt. Man läßt nun das Chloroformextrakt einige Minuten ruhig stehen, danach wird die Lösung vorsichtig abgegossen, das Chloroform verdunstet und der Rückstand 2 Stunden bei 110° getrocknet. Um das überschüssige Isatin zu entfernen, muß der Chloroformrückstand mit heißem Wasser, worin das Isatin leicht löslich ist, ausziehen, bis die abgegossene Flüssigkeit nicht mehr reduziert. Nach dieser Reinigung wird das trockene Residuum mit Schwefelsäure versetzt und als Indigorotdisulfosäure mit Permanganat titriert.

Die Titrierflüssigkeiten müssen ganz klar sein. Beim eventuell nötigen Filtrieren ist ein aliquoter Teil zu untersuchen; man filtriert durch einen kleinen Filter und verwirft die ersten 20—30 *cm*³ des Filtrates. Wenn sich gegen Ende der Titration äußerst fein verteiltes Mangandioxyd in der Flüssigkeit abscheidet, soll man dann und wann während der Titration ein wenig starke $H_2SO_4$ zu der Flüssigkeit hinzufügen.

Die Einstellung der Permanganatlösung erfolgt mit reinem Indigorot in Lösung. Das käufliche Indigorot wird in Chloroform gelöst, das Chloroform verdampft, das Indigorot in Äther aufgenommen, der Rückstand vom Äther getrocknet, 5—10 *mg* genau abgewogen, in konzentrierter Schwefelsäure gelöst und mit Permanganat titriert.

Bei sehr indikanreichem Harn ist es besser, das Filtrat des mit Bleiessig gefällten Harns mit Wasser zu verdünnen. Um den ungefähren Gehalt des Harns an Indikan kennen zu lernen, kocht man gleiche Volumina Harn und Reagens und schüttelt mit Chloroform aus. Beim Gebrauch von 5 *cm*³ Harn mit 5 *cm*³ Reagens und 2 *cm*³ Chloroform färbt sich letzteres bei indikanarmem Harn leicht rosarot, bei leichter Indikanurie schön purpurrot, bei indikanreichem Harn dunkel weinrot.

Bei der Bestimmung entspricht die Hälfte vom gefundenen Werte dem Harnindigo, da die Hälfte des Indigomoleküls vom Isatin geliefert wird.

Zur schnellen Bestimmung des Indikans dient das Indikanurometer von *Bouma*. Dieses besteht aus 11 in einer Reihe geordneten Reagenzröhrchen von gleichem Durchmesser und gleicher Wanddicke. Sechs dieser Röhrchen enthalten eine Lösung von aus Harn bereitetem Indigorot in Chloroform von verschiedener Stärke, welche der Reihe nach übereinstimmt mit einem Gehalte des Harns an Indigo von 5, 10, 15, 20, 30, 40 *mg* pro Liter.

Diese Röhrchen sind auf folgende Weise angefertigt:

Möglichst reines aus Harn dargestelltes Indigorot wird in Chloroform gelöst. Von einem Teil dieser Lösung wird das Chloroform verdunstet und der Gehalt an Indigo mittelst Titration mit Chamaeleon, welches auf reines synthetisches Indigorot gestellt ist, bestimmt. Vom anderen Teil der Lösung des Indigorots werden durch geeignete Verdünnung Flüssigkeiten bereitet, welche der Reihe nach 10, 20, 30, 40, 60 und 80 *mg* Indigo enthalten auf 1 *l* Chloroform. Diese Flüssigkeiten werden als Standardlösungen gebraucht und kolorimetrisch verglichen. Die Röhrchen werden zugeschmolzen und im Dunkeln aufbewahrt. 20 *cm*³ Harn werden mit $^1/_{10}$

seines Volumens an Bleiessig gefällt, durch ein trockenes Filter filtriert. Vom klaren Filtrat, das mit Vorteil vorher mit Schwefelwasserstoff behandelt wird, gießt man $5^1/_2$ *cm*³ (= 5 *cm*³ Harn) in ein Probierröhrchen und fügt eine Lösung (am besten 10 *cm*³) von 20 *mg* Isatin auf 1 *l* starke HCl hinzu. Man erhitzt nun die Mischung zur Siedehitze, kocht einige Sekunden und kühlt ab, schüttelt tüchtig mit 5 *cm*³ Chloroform. Die Chloroformlösung wird mit der Standardlösung verglichen. Bei Benutzung des *Meisling*schen Kolorimeters kann der Gebrauch der Vergleichsröhrchen umgangen werden *(Oerum)*.

Zur quantitativen Bestimmung des Harnindikans kann man sich statt Eisenchlorids der Kupfersulfatlösung bedienen *(Salkowski)*.

*Imabuchi*[1]) verfuhr dabei folgenderweise: Der nötigenfalls schwach mit Essigsäure angesäuerte Harn wird mit $^1/_{10}$ Volumen Liquor ferri subacetici gefällt. Man versetzt 50 *cm*³ des Harnfiltrats in einem Schütteltrichter mit 1—2 *cm*³ 10%iger Kupfersulfatlösung und setzt das gleiche Volumen Salzsäure (spez. Gew. 1·19) hinzu. Die Harnfiltratreagensmischung wird nach 5—10 Minuten mit Chloroform wiederholt ausgeschüttelt, zuerst mit 50, dann mit je 20 *cm*³, bis eine neue Portion Chloroform sich nicht mehr färbt. Die abgelassenen Chloroformlösungen bleiben in einem anderen Schütteltrichter einige Minuten stehen und werden durch ein trockenes Filter in einem trockenen Kolben filtriert. Das Chloroform wird dann auf dem Wasserbad abdestilliert, der Rückstand auf dem Wasserbad noch einige Minuten lang getrocknet, dann mit heißem Wasser 3—4mal ausgewaschen, bis das letzte Waschwasser Permanganat nicht mehr entfärbt. Der gereinigte Indigo wird nach Abgießen des Wassers mit 10 *cm*³ reiner, konzentrierter Schwefelsäure aufgenommen und dann 5—10 Minuten lang auf dem kochenden Wasserbade erwärmt. Nach dem Erkalten wird die Schwefelsäurelösung mit etwa 100 *cm*³ destilliertem Wasser verdünnt und mit einer $^1/_{400}$ n-Kaliumpermanganatlösung titriert. 1 *cm*³ derselben entspricht 0·165 *mg* Indigo *(Wang)*.

Indol-Pr-3-Essigsäure (Strukturformel: CH, CH, CH, CH, C, C, C — $CH_2$ . COOH, CH, NH) $C_{10}H_9NO_2$ ist das Chromogen des Uroroseins (siehe dieses).[2])

Indigrot (Indirubin, Indigpurpurin[3]) $C_{16}H_{10}N_2O_2$ (Strukturformel: $C_6H_4$, CO, C, NH ‖ CO, $C_6H_4$, C, NH) Nadeln oder

---

[1]) *T. Imabuchi*, Zur Methodik der quantitativen Bestimmung des Harnindikans. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **60**. S. 502 (1909).

[2]) *C. A. Herter*, Die Indolessigsäure, das Chromogen des Uroroseins im Harn. Journ. of biol. Chem. Vol. **4**. p. 253 (1903).

[3]) *H. Rosin*, Über das Indigorot (Indirubin). *Virchows* Archiv. Bd. **123**. S. 519 (1891); vgl. auch *L. C. Maillard*, Chem. Ztg. Jg. **1901**. S. 415.

rhombische Blättchen, sublimiert bei 295—310° mit violettroten Blättchen. Unlöslich in Wasser, löslich mit kirschroter Farbe in Alkohol, Äther, Chloroform, Eisessig. Mit Traubenzucker in alkalischer Lösung erwärmt, geht es in Indirubinweiß über.

Entsteht neben dem isomeren Indigblau bei Erwärmen von Indoxylschwefelsäure im Harn mit Salzsäure und bei mäßiger Oxydation.

Darstellung nach *Rosin* erfolgt in folgender Weise. Etwa 300 *cm*³ indikanreicher Harn werden zu je 5 *l* mit basischem Bleiacetat ausgefällt, filtriert, das im Überschuß vorhandene Blei aus dem Filtrate durch Salzsäure entfernt und die filtrierte Lösung mit Salpetersäure (auf 1 *l* ca. 20 *g*) und sofort bis nahezu zum Sieden erhitzt, bis zur dunkelkirschroten Färbung; man kühlt rasch ab und fügt Soda bis zur schwach sauren Reaktion hinzu. Der ausgefallene Farbstoff (Indigrot, Indigblau und andere Farbstoffe) wird nun aus den verschiedenen Harnportionen durch dasselbe Filter abfiltriert; man wäscht den Rückstand mit Soda und Wasser und extrahiert nach dem Trocknen mit Chloroform am Rückflußkühler auf dem Wasserbade, bis sich dasselbe nicht mehr dunkelpurpur, sondern blau färbt. Man destilliert aus den Chloroformauszügen das Chloroform soweit ab, daß das Indigrot mit etwas Indigblau ausfällt. Man filtriert nach dem Erkalten das ausgefallene Indigrot ab, wäscht mit kaltem Chloroform, bis das Filtrat schön purpur gefärbt abläuft. Der Rückstand wird zur weiteren Reinigung mit Äther am Rückflußkühler gekocht, die ätherische Lösung des Indigrotes bis zur Abscheidung der Kristalle abdestilliert. Zum Nachweis wird der mit Soda neutralisierte Harn mit Äther ausgeschüttelt und der Äther verdunstet. Das Urorosein wird von Alkalien sofort entfärbt und geht nicht in den Äther über.

## ANHANG.

Zur Übersicht über die Stickstoffverteilung im Harn dient das Verfahren von *M. Pfaundler* und das von *M. Krüger* und *J. Schmid*.

Verfahren von *M. Pfaundler*.[1])

Der 24stündige Harn wird über Chloroform aufgefangen, mit stickstofffreier Salzsäure angesäuert und durch Verdünnen mit ungefähr einem halben Teil Wasser auf bestimmtes Volumen gebracht. Damit werden folgende Bestimmungen ausgeführt:

1. Ermittlung des Gesamtstickstoffs nach *Kjeldahl*.

2. und 3. Bestimmung des Ammoniak- und leicht abspaltbaren Stickstoffs ($n_1$ und $f_1$).

20 *cm*³ der Flüssigkeit werden mit etwa 40 *cm*³ salzsaurer Phosphorwolframsäurelösung (100 *g* Phosphorwolframsäure *(Merck)* + 100 *cm*³ HCl von 1·124 spez. Gew. + 800 *cm*³ destilliertes Wasser) gefällt. Nach 24stündigem Stehen der Proben in ammoniakfreier Atmosphäre wird durch ein aschearmes (stickstofffreies) Filter in einen Erlenmeyerkolben klar filtriert, der Niederschlag mit Hilfe des Filtrates quantitativ übergespült und zwei- bis dreimal mit der zur Fällung verwendeten Lösung gewaschen. Hierbei darf sich das Filtrat nicht mehr trüben. Filter mit Niederschlag wird hierauf gleichfalls in einen Erlenmeyerkolben gebracht und gleich dem Filtrat mit etwa 10 *g* kristallisierter Phosphorsäure (oder mit dem gleichen Gewichte Metaphosphorsäure) versetzt. Beide Kolben kommen für 18—20 Stunden in einen auf 150° eingestellten Trockenschrank. Nach Abkühlung der Proben

[1]) *M. Pfaundler*, Über ein Verfahren zur Bestimmung des Amidosäurenstickstoffs im Harne. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **30**. S. 75 (1900).

werden diese mit heißem Wasser in einem Rundkolben aus Hartglas von ca. 1 *l* Inhalt gespült, mit stickstofffreier Natronlauge zunächst vorsichtig annähernd neutralisiert, dann mit einem großen Überschuß von geglühter Magnesia bis zur deutlich alkalischen Reaktion versetzt und in eine mit $^1/_{10}$ n-Säure beschickte Vorlage abdestilliert. Gegen das heftige Stoßen der Flüssigkeit ist durch Eintragen von pulverisiertem, geglühtem Bimsstein vorzubeugen. Die Destillation wird nach Verdünnen des Kolbeninhaltes mit Wasser nochmals wiederholt.

4. und 5. Bestimmung des durch Säure nicht abspaltbaren Stickstoffs ($f_2$ und $n_2$) im Niederschlage, wie in der Fällung nach der Phosphorwolframsäurebehandlung.

Nach beendeter zweiter Destillation wird der Kolbenrückstand behufs Stickstoffbestimmung nach *Kjeldahl* zersetzt (man soll große Mengen von Zersetzungssäure anwenden und den Kolben häufig drehen).

Fraktion $n_1$ enthält: den durch Phosphorsäure abspaltbaren Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen: den gesamten N des Ammoniaks, der Carbaminsäure, des Rhodans und einen Teil des N der Harnsäure, der Purinbasen, des Kreatinins, des Harnmukoides, der Eiweißkörper bzw. des Nukleoalbumins des normalen Harns.

Fraktion $n_2$: durch Phosphorsäure nicht abspaltbarer Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Körper. Dies ist der N-Rest jener Substanzen, die wie Harnsäure nur einen Teil des Stickstoffes festgebunden enthalten; ferner der N der Diamine, der Diaminosäuren und der etwa vorkommenden Ptomaine.

Fraktion $f_1$: leicht abspaltbarer N der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Körper, das sind der gesamte Stickstoff des Harnstoffs, des Allantoins, der Oxalursäure, eventuell ein Teil des Kreatinstickstoffs, wie auch wahrscheinlich etwas mehr als die Hälfte des Oxyproteinsäurestickstoffs.

Fraktion $f_2$: festgebundener Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Körper. Das sind die Aminosäuren und ihre Derivate und ein Teil der Oxyproteinsäure.

### Verfahren nach *Krüger* und *Schmid*.[1]

Prinzip: Harnstoff und Aminosäuren werden durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt, hingegen andere stickstoffhaltige Körper. Wird das Filtrat mit Schwefelsäure im geschlossenen Rohr auf 160—180° erhitzt, so spaltet Harnstoff quantitativ sauren N ab, die Aminosäuren spalten hingegen keinen Stickstoff ab.

Man ermittelt zunächst nach *Pflüger* und *Gumlich* die zur vollständigen Fällung des Harnes (wenn konzentriert, vorher verdünnen) notwendige Menge Phosphorwolframsäure, indem man zu je 10 *cm*³ Harn 1 *cm*³

[1]) *Krüger* und *J. Schmid*, Die Bestimmung des Amidosäurestickstoffs im Harne. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **31**. S. 556 (1900/1). Bezüglich der Stickstoffverteilung im Harn vgl. auch: *G. Satta*, Bemerkungen über die Stickstoffverteilung im Harn. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **6**. S. 358 (1905).

10%ige HCl und dann wechselnde Mengen 10%iger Phosphorwolframsäure gibt. Der Niederschlag setzt sich in allen Fällen leicht ab. Man filtriert nach 2 Minuten (eventuell muß es nochmals zurückgegossen werden). Tritt nach 2 Minuten keine Trübung mehr ein, so ist die Fällung vollständig. Ist die Säurezahl gefunden, so gibt man zu einer größeren Menge (etwa 30 $cm^3$) Harn 3 $cm^3$ 10%ige Salzsäure und die berechnete Menge an Phosphorwolframsäure-Lösung hinzu und filtriert nach 2 Minuten durch ein trockenes Filter in ein trockenes Gefäß. Nach Herstellung des Filtrates werden folgende Bestimmungen ausgeführt:

1. In 5 $cm^3$ des ursprünglichen Harnes wird der Gesamtstickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt.

2. In je 10 $cm^3$ des Phosphorwolframsäurefiltrates, respektive einer solchen Menge, die 5 $cm^3$ Harn annähernd entspricht, wird

*a)* der Gesamtstickstoff („Harnstoffstickstoff plus Aminosäurenstickstoff") nach *Kjeldahl*;

*b)* der Harnstoffstickstoff bestimmt durch Erhitzen mit dem halben Volumen konzentrierter Schwefelsäure während 3—4 Stunden, die Zeit des Anwärmens nicht gerechnet, auf 160—180° im geschlossenen Rohr. Der Röhreninhalt wird in einen Kjeldahldestillierkolben gegossen, die Röhren der Reihe nach mit Wasser, dann mit wenig Natronlauge (um den Niederschlag von phosphorwolframsaurem Ammon zu lösen) und schließlich wieder mit Wasser nachgespült. Beim Neutralisieren der Schwefelsäure ist ein Überschuß an Lauge zu vermeiden. Für 5 $cm^3$ konzentrierter $H_2SO_4$ genügen 20—22 $cm^3$ 33%ige Natronlauge. Man destilliert das Ammoniak in vorgelegte titrierte Säure.

Die Differenz zwischen 2*a)* und 2*b)* gibt den Aminosäurenstickstoff an.[1])

## Nicht dialysable stickstoffhaltige Bestandteile des Harnes mit Ausschluß der Eiweißkörper.

Zu diesen gehört die Chondroitinschwefelsäure,

$$C_{18}H_{26}NO_{13} . SO_3OH,$$

eine Ätherschwefelsäure.

Zur quantitativen Bestimmung der im Harn ausgeschiedenen Chondroitinschwefelsäure kann man nach *Pons* [2]) wie folgt verfahren:

Der möglichst frische Harn wird filtriert, eventuell unter Toluol aufbewahrt. Eine abgemessene Menge von 200—500 $cm^3$ wird 3—5 Tage

[1]) Zur Stickstoffverteilung vgl. auch: *D. E. Lindsay,* A method for the estimation of urea, allantoin and amino-acids in the urine. The Bio-Chemical Journ. Vol. **4**. p. 448 (1909).

[2]) *Ch. Pons,* Quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung der Chondroitinschwefelsäure. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **9**. S. 393 (1907). — *K. A. H. Mörner,* Untersuchungen über die Proteinstoffe und die eiweißfällenden Substanzen des normalen Menschenharns. Skand. Arch. f. Physiol. Bd. **6**. S. 332 (1895). — *C. Th. Mörner,* Einige Beobachtungen über die Verbreitung der Chondroitinschwefelsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **20**. S. 357 (1895).

in Dialysierschläuchen gegen fließendes Leitungswasser dialysieren gelassen, dann mit 10 *cm*³ gesättigten Barytwassers versetzt, 24 Stunden damit stehen gelassen und durch ein Barytfilter unter öfterem Zurückgießen filtriert, bis das Filtrat völlig klar ist. Die Fällung mit Baryt ist notwendig, um die aus dem Leitungswasser stammende Schwefelsäure zu entfernen. Das gesamte Filtrat wird in einem geräumigen Kolben (meist Kjeldahlkolben) mit 10 *cm*³ Bariumchlorid und 10 *cm*³ konzentrierter HCl bis zur Hälfte eingekocht, nochmals mit 10 *cm*³ konzentrierter Salzsäure versetzt und bis auf 26—30 *cm*³ eingedampft. Das ausgeschiedene Bariumsulfat wird auf ein aschefreies Filter gebracht, chlorfrei gewaschen und nach dem Glühen gewogen. Manchmal ist es schwierig, beim Filtrieren des mit Barytwasser versetzten dialysierten Harnes ein klares Filtrat zu erhalten. Durch nochmaligen Barytzusatz und Einleiten von $CO_2$ gelangt man zum Ziele.

Die freie Chondroitinschwefelsäure ist sehr leicht zersetzlich. Ihre wässerigen Lösungen werden gefällt durch basisches Bleiacetat, Zinnchlorür, Quecksilberoxydulnitrat, nicht gefällt durch andere Metallsalze, Mineralsäuren, Essigsäure. Aus Lösungen, die Eiweiß oder Leim enthalten, wird sie durch Essigsäure und Mineralsäuren gefällt; die Fällung ist im Überschuß der Mineralsäure löslich. Bei Einwirkung von konzentrierten Säuren spaltet sie neben einem Kohlenhydrat Schwefelsäure ab.

Zur Untersuchung adialysabler Stoffe im Harn ist von *Hofmeister* der Gebrauch von Schilfschläuchen eingeführt worden.[1])

Die Schilfschläuche sind, wenn unverletzt, völlig porenfrei und lassen dialysierende Stoffe leicht durchtreten. Ein Schlauch von 15—20 *cm* Länge und etwa 10 *cm*³ Fassungsraum wird an einem Ende fest zugeschnürt, in das andere Ende wird ein trichterförmig gestaltetes Glasrohr eingebunden. Da die Schläuche nur einige Kubikzentimeter fassen, empfiehlt es sich, zwei bis drei durch kurze, mit Nuten versehene Glasröhren zu verbinden. Zuerst prüft man den Schlauch durch Füllen mit Wasser und Stehenlassen auf seine absolute Intaktheit, füllt ihn dann mit dem zu untersuchenden Harn, hängt ihn mit dem trichterförmigen Ansatz in einen mit passenden Öffnungen versehenen Holzrahmen und taucht ihn in einen mit destilliertem Wasser gefüllten Zylinder, dessen Inhalt sich selbsttätig rasch erneuert. Bei passender Wahl der Gefäße können gleichzeitig mehrere (6—9) Schläuche in den Rahmen eingesetzt werden. Es ist ratsam, durch einen kleinen Motor den Rahmen durch kurze Stöße erschüttern zu lassen.

---

[1]) Vgl. die Arbeiten von *P. Philippson*, Über die Verwendbarkeit der Schilfschläuche zur Dialyse. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **1**. S. 80 (1902). Über die Bereitung der Schilfschläuche findet sich in dieser Arbeit folgende Vorschrift: Möglichst dicke Schilfrohre werden in ihre Segmente geteilt und diese eine Stunde in kochendes Wasser gelegt. An einem Segmentende wird hierauf durch sorgfältiges Abschneiden eine Strecke der innersten Membran freigelegt und der kleine Membranzylinder mit einem Seidenfaden zugebunden. Dieses zugebundene Ende wird auf einem abgerundeten Glasstab durch das ganze Segment durchgeschoben. Die Membran löst sich dabei von der Schilfwand und befindet sich schließlich in ganzer Ausdehnung auf dem Glasstab. Die Dicke der Wand beträgt etwa 0·08 *mm*. Die Schläuche bestehen fast aus reiner Zellulose. — *Kumoji Sasaki*, Bestimmung der nicht dialysablen Stoffe des Harnes. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **9**. S. 386 (1907). — *M. Savaré*, Der Gehalt des Frauenharnes an adialysablen Stoffen unter normalen und pathologischen Verhältnissen. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **9**. S. 401 (1907).

Die leicht dialysierbaren Stoffe (Salze) entfernt man so rasch. Hält man die Dialyse für beendet, so entleert man den Inhalt durch Anschneiden des unteren Schlauchendes mit einer feinen Schere in ein untergehaltenes gewogenes Schälchen, spült mit destilliertem Wasser durch das trichterförmige Ansatzrohr nach, bringt die Flüssigkeit zur Trockene und wägt den Rückstand.

Vorheriges Einengen des Harnes empfiehlt sich nicht. Zersetzung des Harnes während der Dialyse wurde nicht beobachtet. Die Entfernung der dialysablen Stoffe war durchschnittlich in 24—36 Stunden erreicht.

Wichtige Beobachtungen über adialysable Stoffe haben *Abderhalden* und *Pregl* [1]) angestellt.

Der Trockenrückstand vom menschlichen Harn, in dem weder mit *Esbach*schem Reagens, noch mit konzentrierter $HNO_3$ Eiweiß nachgewiesen werden konnte, wurde dabei mit absolutem Alkohol extrahiert und aus dieser Lösung durch Eintragen von gepulverter Oxalsäure die Hauptmenge des Harnstoffes entfernt. Aus dem Filtrat vom Harnstoffoxalat wurde die überschüssige Oxalsäure mit Baryt und aus dem neuerlichen Filtrat der Baryt mit Schwefelsäure entfernt. Durch mehrtägige Dialyse des Filtrates vom Baryumsulfat wurden die letzten Reste kristallinischer Substanzen möglichst entfernt. Nach dem Einengen der Dialysenflüssigkeit auf ein kleines Volumen stellt dieses Präparat eine durchsichtige, bräunliche sirupöse Flüssigkeit dar. Freie Aminosäuren enthielt das Präparat nicht; die Säurehydrolyse ergab: Glykokoll, Alanin, Phenylalanin, Asparagin und Glutaminsäure. Die Verbindung hat den Charakter eines „Polypeptids".

Ferner machte *E. Salkowski* [2]) Mitteilungen über alkoholunlösliche bzw. kolloidale Stickstoffsubstanzen im Harn. Die in Wasser löslichen Stickstoffbestandteile des durch Alkohol im Harn erhaltenen Niederschlages dialysieren nicht. Sie sind nicht einheitlicher Natur; es sind darin mindestens zwei Körper vorhanden, ein stickstoffreicherer und ein stickstoffärmerer, die durch Behandlung mit Tierkohle bis zu einem gewissen Grade getrennt werden können.[3])

## Farbstoffe im Harn.

1. Gallenfarbstoffe.

Zum Nachweis der Gallenfarbstoffe dienen folgende Reaktionen:

1. *Huppert*sche Probe nach der Modifikation von *E. Salkowski.* [4])

[1]) *E. Abderhalden* und *Fr. Pregl,* Über einen im normalen menschlichen Harn vorkommenden, schwer dialysierbaren Eiweißabkömmling. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 19 (1905).

[2]) *E. Salkowski,* Zur Kenntnis der alkoholunlöslichen bzw. kolloidalen stickstoffhaltigen Substanzen im Harn. Berl. kl. Wochenschr. Bd. **42**. S. 1582 (1906).

[3]) Über kolloidale Stoffe im Urin vgl. auch: *Lichtwitz* und *O. Rosenbach,* Untersuchungen über Kolloide im Urin. I. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **61**. S. 112 (1909).

[4]) *E. Salkowski,* Praktikum. S. 189; vgl. auch *I. Munk,* Über den Nachweis von Gallenfarbstoff im Harn. Arch. f. Anat. u. Physiol. Jg. **1898**. S. 361. Vgl. zu diesem Abschnitt auch Bd. **2**. S. 732 ff.

Man macht den Harn mit einigen Tropfen Natriumkarbonat alkalisch und versetzt tropfenweise mit Chlorcalciumlösung, bis die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit keine andere als die normale Harnfärbung zeigt. Den entstandenen Niederschlag filtriert man ab, wäscht gut aus, bringt ihn in ein Reagenzglas, übergießt mit Alkohol und löst den Niederschlag in Salzsäure. Man kocht die klare Lösung. Bei Gegenwart von Gallenfarbstoff färbt sie sich grün bis blau; fügt man nun zur völlig erkalteten Lösung Salpetersäure hinzu, so wird die grüne Lösung blau, violett, rot. Auf diese Weise kann man 0·02—0·01 *mg* Bilirubin in 10 $cm^3$ Harn nachweisen.

2. Nach *Hammarsten*[1]) benutzt man ein Säuregemisch, das aus 1 Teil 25%iger Salpetersäure und aus 19 Teilen 25%iger Salzsäure besteht und durch Stehen gelblich geworden sein muß.

Vor jedesmaligem Gebrauch mischt man 1 Teil des Säuregemisches mit 4 Teilen Alkohol und fügt zu einigen Kubikzentimetern dieser Lösung einige Tropfen des bilirubinhaltigen Harnes; es entsteht eine grüne Farbe.

Oder man verfährt nach *Hammarsten* so, daß man 10 $cm^3$ Harn in ein etwa 15 $cm^3$ fassendes Rohr einer Zentrifuge bringt; man setzt einige Kubikzentimeter Chlorcalciumlösung zu, mischt und zentrifugiert ca. 1 Minute. Die etwas trübe Flüssigkeit gießt man vom Bodensatz ab, bringt 1—2 $cm^3$ des Reagens hinzu; es entsteht eine grüne Lösung. Oder man verteilt den Bodensatz in 1—2 $cm^3$ des Reagens und zentrifugiert von neuem etwa $1/2$ Minute. Bei Gegenwart von Gallenfarbstoff entsteht eine klare, grüne Flüssigkeit oberhalb des Bodensatzes. Empfindlichkeit 1:500.000—1,000.000. Sind nur Spuren von Gallenfarbstoff vorhanden, so ist es vorteilhaft, ein Reagens mit mehr Alkohol und weniger des Säuregemenges, z. B. 1 Volumen Säuregemenge auf 9 Volumen Alkohol, oder ein Säuregemenge mit weniger Salpetersäure, 1 $HNO_3$ und 99 HCl, zu verwenden.

3. Die *Gmelin*sche Probe in der Modifikation von *Rosenbach* wird so ausgeführt, daß der Harn durch ein kleines Filter filtriert wird, dann läßt man das ausgebreitete Filter auf trockenem Filterpapier absaugen und benetzt das noch feuchte Filter mit Tropfen von Salpetersäure, die sehr wenig salpetrige Säure enthält. Um den Tropfen bilden sich konzentrische Ringe, die von innen nach außen gelbrot, rot, violett, blau und grün gefärbt sind.

Die *Huppert-Salkowski*sche Reaktion wird nach *J. C. Schippers*[2]) wie folgt ausgeführt: 10 $cm^3$ Harn werden mit einigen Tropfen $Na_2CO_3$ neutralisiert, nach der Neutralisation setzt man noch 5 Tropfen der Sodalösung (20%) hinzu und dann 10 Tropfen $CaCl_2$ (20%). Der Niederschlag wird auf gehärtetes Filter gesammelt, mit Wasser ausgewaschen, abgeschabt, in einer kleinen Porzellanschale mit 3 $cm^3$ Salzsäurealkohol

---

[1]) *O. Hammarsten,* Ein Verfahren zum Nachweis der Gallenfarbstoffe, insbesondere im Harn. Skand. Arch. f. Phys. Bd. 9. S. 313 (1899); vgl. auch: Eine neue Reaktion auf Gallenfarbstoffe, insbesondere im Harn. *Malys* Jahresber. Bd. 28. S. 310 (1898).

[2]) *J. C. Schippers,* Gallenfarbstoffreaktionen im Harne. Biochem. Zeitschr. Bd. 9. S. 241 (1908); vgl. auch *F. A. Steensma,* Biochem. Zeitschr. Bd. 8. S. 208 (1908) und *E. Salkowski,* Arb. aus d. path. Inst. Berlin. Jg. **1906**. S. 504.

übergossen, in einem Reagenzrohre erhitzt und eventuell ein Tropfen einer $^1/_2$%igen Lösung $NaNO_2$ hinzugefügt.

Erwähnenswert sind noch die Modifikationen von *Nakayama* und *Bouma.*

*Nakayama*[1]) versetzt 5 *cm*³ Harn mit dem gleichen Volumen $BaCl_2$ (10%ige Lösung). Das Gemisch wird zentrifugiert, die Flüssigkeit abgegossen und der Niederschlag mit 2 *cm*³ des Reagenzes (99 *cm*³ Alkohol von 95 Vol.% und 1 *cm*³ rauchende Salzsäure, worin 4 *g* Eisenchlorid pro Liter gelöst sind) zum Sieden erhitzt. Bei Anwesenheit von Gallenfarbstoff nimmt die Flüssigkeit eine grüne bis blaugrüne Farbe an. Nach Zusatz von (gelbgefärbter) Salpetersäure geht die Farbe in Violett und Rot über. Empfindlichkeit: 1 Teil Bilirubin auf 1,200.000 Harn. *J. Bouma*[2]) versetzt 8 *cm*³ sauren Harn mit 2 *cm*³ $CaCl_2$ (10%), versetzt mit schwacher Ammoniaklösung bis zu sehr schwach sauer, nahezu neutral, zentrifugiert, wiederholt das Zentrifugieren nach Mischen des Sedimentes mit destilliertem Wasser, gießt die obenstehende Flüssigkeit ab (falls der Harn Urobilin enthält, zeigt diese den typischen Absorptionsstreifen in grün-blau) und löst den Niederschlag in einer Mischung von 1 *cm*³ *Obermayer*schem Reagens (2 *g* $FeCl_3$ in 1 *l* Salzsäure) mit 4 *cm*³ absolutem Alkohol. Bei Anwesenheit von Gallenfarbstoff löst sich das Sediment sofort mit grüner Farbe im Reagens. Man kann so 1 *mg* Gallenfarbstoff in 1 *l* urobilinhaltigem Harn nachweisen.[3])

*Pröscher*[4]) verwendet die *Ehrlich*sche Diazoreaktion zum Nachweis des Bilirubins. Setzt man *Ehrlichs* Diazolösung zu einer $^1/_3$ Volumen Alkohol enthaltenden, mit konzentrierter Salzsäure stark angesäuerten Bilirubinlösung, so tritt Blaufärbung auf, oder bei Spuren von Bilirubin nur dunklere Färbung, die beim Schütteln mit blauer oder blauvioletter Farbe in Chloroform übergeht. Empfindlichkeit: 1 : 60.000 (bei der *Huppert-Salkowski*schen Probe 1 : 500.000 bis 1 : 1.000.000). Für klinische Zwecke empfiehlt *Pröscher*, den Farbstoff zunächst durch Sättigen von 10 *cm*³ Harn durch Ammonsulfat zu fällen, den alkoholischen Auszug des farbigen Niederschlages,

---

[1]) *Nakayama,* Über eine Modifikation der *Huppert*schen Gallenfarbstoffreaktion. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **36**. S. 398 (1902).

[2]) *J. Bouma,* Zur Frühdiagnose des Ikterus. Deutsche med. Wochenschr. Jg. **1902**. S. 866. *J. Bouma,* Eine klinische Methode zur quantitativen Bestimmung der Gallenfarbstoffe. Deutsche med. Wochenschr. Bd. **30**. S. 881 (1904).

[3]) Vgl. auch die Modifikation von *Arnold* (*Maly,* 1899. S. 328): „Über die Methoden zum Nachweis des Gallenfarbstoffes im Harn und ihre Bedeutung für die Klinik."

[4]) *Fr. Pröscher,* Über Acetophenonazobilirubin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 411 (1900). — Über den Nachweis von Bilirubin im Harne mittelst der *Ehrlich*schen Diazoreaktion. Zentralbl. f. inn. Med. Bd. **22**. S. 169 (1901); vgl. auch *A. Krokiewicz* und *J. Batko,* Eine sehr empfindliche Reaktion auf Gallenfarbstoffe im Harn als Modifikation der *Ehrlich*schen Methode mit Diazobenzolsulfosäure. Wiener klin. Wochenschr. Jg. 1898. S. 173. Bezüglich der Reaktionen auf Gallenfarbstoffe mittelst Azurblau, Methylviolett und anderer Farbstoffe vgl. *A. Torday* und *A. Klier,* Deutsche med. Wochenschr. Jg. **1909**. S. 1470.

stark mit Salzsäure angesäuert, mit Diazolösung zu versetzen. Bei Gegenwart von Bilirubin tritt Blaufärbung ein; bei Unterschichtung mit Kalilauge ein grün-rot-blauer Farbenring.

Oder man verfährt nach *Krokiewicz* so, daß in ein Reagenzglas je 2 $cm^3$ von einer 1%igen wässerigen Lösung von Ac. sulfanilic. und einer 1%igen wässerigen Lösung von Natriumnitrit, hierauf 2—5 Tropfen des gallenfarbstoffhaltigen Harnes gegossen werden. Die entstandene rubinrote Färbung geht nach dem Zusatz von 1—2 Tropfen Salzsäure in Amethystviolett über.

Zum Nachweis des Bilirubins in den Fäzes behandelt man den wässerigen Extrakt derselben nach *Huppert-Salkowski* oder man verfährt nach *Steensma*[1]) wie folgt: Etwa 5 *g* Fäzes werden in einer Reibschale mit 95% Alkohol zusammen verrieben, dann erhitzt man die Mischung in einem Kolben auf dem Wasserbade, gießt den Alkohol nach einiger Zeit ab und wiederholt die Extraktion mit Alkohol, bis der Alkohol fast keinen Farbstoff mehr aufnimmt. Der Rückstand wird dann in der Reibschale nach Zusatz von etwas Kalilauge mit Alkohol verrieben, die Flüssigkeit filtriert, die Flüssigkeit mit wenig salzsäurehaltigem Alkohol (95% Alkohol und 5 $cm^3$ konzentrierter Salzsäure) angesäuert und gekocht. Wenn keine grüne Farbe entsteht, setzt man noch 1 Tropfen einer 0·5%igen Natriumnitritlösung hinzu.

Vgl. auch die Probe von *A. Schmidt.*[2])

2. Urobilin.

Kommt im frischen Harn als Chromogen, Urobilinogen, vor.

Darstellung aus dem Harn.

1. Nach *Jaffé.*[3]) Man fällt eine große Menge Harn mit Bleiessig aus, kocht den mit Wasser gewaschenen und getrockneten Niederschlag mit Alkohol mehrmals aus und zerlegt ihn dann mit Schwefelsäure enthaltendem absolutem Alkohol. Die Lösung wird mit einem Überschuß von Ammoniak versetzt, das Filtrat mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und mit wässeriger oder alkoholischer Chlorzinklösung ausgefällt. (Bei urobilinreichem Harn kann dieser direkt mit einem großen Überschuß von Ammoniak gefällt und das Filtrat mit einer konzentrierten Chlorzinklösung versetzt werden.) Die voluminösen roten oder rotbraunen Niederschläge wäscht man mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion, man kocht mit Alkohol aus, trocknet bei gelinder Wärme, pulverisiert, löst in Ammoniak und fällt die filtrierte Flüssigkeit mit Bleizucker, wäscht den roten Nieder-

---

[1]) *Steensma,* Über den Nachweis kleiner Mengen Gallenfarbstoffe in Faeces und Blut. Zentralbl. f. d. ges. Therapie und Path. des Stoffwechsels. Bd. **3**. S. 231 (1908).

[2]) *R. Schorlemmer,* Über den Nachweis von Gallenfarbstoff in den Fäzes in Sonderheit mit der *Ad. Schmidt*schen Probe und über die klinische Bedeutung des Vorkommens von Bilirubin in denselben. Münchn. Med. Wochenschr. Jg. **1900**. S. 458.

[3]) *M. Jaffé,* Zur Lehre von den Eigenschaften und der Abstammung der Harnpigmente. *Virchows* Arch. Bd. **47**. S. 405 (1869) und Zentralbl. f. med. Wissensch. Bd. **6**. S. 243 (1868); vgl. auch *Saillet,* De l'urobiline dans les urines normales. Rev. de méd. T. **17**. p. 109 (1897).

schlag kurze Zeit mit kaltem Wasser, trocknet und digeriert ihn mit schwefelsäurehaltigem Alkohol. Die alkoholische Lösung wird nun mit dem halben Volumen Chloroform vermischt und mit viel Wasser geschüttelt. Die abgesetzte Chloroformlösung wird noch 1—2mal mit wenig Wasser gewaschen, dann das Chloroform abdestilliert.

2. Nach *Méhu* und *Fr. Müller.*[1]) Der Harn wird zur Entfernung des Gallenfarbstoffs, des Hämatoporphyrins und der Harnsäure zunächst mit einer alkalischen Chlorbariumlösung (auf 100 Teile Harn verwendet man 30 $cm^3$ einer Mischung von einem Volumen gesättigter Chlorbariumlösung und 2 Volumen gesättigtem Barytwasser) gefällt. Aus dem Filtrat entfernt man den überschüssigen Baryt durch konzentrierte Natriumsulfatlösung, neutralisiert die Flüssigkeit nahezu mit Schwefelsäure, filtriert und sättigt mit Ammonsulfat. Der Niederschlag wird auf dem Filter gesammelt, mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, und nachdem er lufttrocken geworden ist, mit einer Mischung von 1 Volumen Äther und 2 Volumen Alkohol in der Wärme ausgezogen. Die abfiltrierte Lösung versetzt man mit Chloroform und schüttelt die Mischung mit ungefähr dem doppelten Volumen Wasser. Das Chloroform setzt sich nach einiger Zeit ab und kann abgelassen werden. Man entzieht dem mit Wasser gewaschenen Chloroform das Urobilin mit ammoniakalischem Wasser. Die Behandlung der Chloroformlösung mit Ammoniak (viel Ammoniak ist zu vermeiden), bewirkt eine Trennung des Urobilins vom Indigrot. Aus der ammoniakalischen Lösung vertreibt man das Ammoniak in der Wärme. Aus der ammoniakalischen Lösung kann der Farbstoff auch mit Säure gefällt und wieder in Chloroform gelöst werden. Die Chloroformlösung wird nun am besten in vorher gewogenen Glasschälchen bei gewöhnlicher Temperatur verdunstet und nach Trocknen im Exsikkator gewogen.

3. Nach *Garrod* und *Hopkins.*[2])

Zunächst wird aus dem Harn die Harnsäure durch Sättigen desselben mit Salmiak entfernt, im Filtrat Ammonsulfat gelöst, wodurch beim Stehen ein Niederschlag von Urobilin entsteht. Der Niederschlag wird nach dem Trocknen mit großen Mengen Wasser ausgezogen, die Sättigung mit Ammonsulfat und die nachherige Extraktion, wenn nötig, öfter wiederholt, zum Schluß die Niederschläge getrocknet und mit absolutem Alkohol ausgezogen. Oder man extrahiert den Niederschlag mit verdünntem Ammoniak. Aus der ammoniakalischen Lösung des Urobilins kann es nach schwachem Ansäuern mit Schwefelsäure als amorphes braunes Pulver gefällt werden.

Oder man verfährt nach *Garrod* und *Hopkins* so, daß man den Harn zuerst mit Chlorammon sättigt, das Filtrat mit Schwefelsäure ansäuert, mit Ammonsulfat sättigt, dann in einem Scheidetrichter mit dem gleichen

---

[1]) Nach *Neubauer-Vogel-Huppert,* 10. Aufl. S. 527.

[2]) *A. E. Garrod* und *G. Hopkins,* On urobilin. Journ. of physiol. Vol. **20**. p. 118 (1896).

Volumen einer Mischung von einem Volumen Chloroform und 2 Volumen Äther schüttelt. Der Äther-Chloroformmischung entzieht man den Farbstoff durch Wasser besonders leicht, wenn dem Wasser eine Spur Alkali zugesetzt wird.

Der Nachweis des Urobilins erfolgt:

1. Nach *Jaffé*, indem man das Filtrat nach Ammoniakzusatz mit etwa 5 Tropfen 10%iger Chlorzinklösung versetzt und auf grüne Fluoreszenz wie auf die Absorptionsstreifen. Man macht mit Ammoniak stark alkalisch und fügt dem Filtrat nur so viel Zinksalzlösung zu, daß kein bleibender Niederschlag entsteht.

Charakteristisch sind die Absorptionsstreifen auch in sehr verdünnten sauren Lösungen zwischen *b* und *F*, näher dem letzteren liegend. Die Absorptionsstreifen treten manchmal erst nach längerem Stehen des Harns auf. In alkalischen Lösungen ist der Streifen mehr nach *b* gerückt.

2. Nach *Nencki* und *Rotschy*[1]) säuert man 10—20 $cm^3$ Harn mit einigen Tropfen Salzsäure an und schüttelt dann gelinde mit 5—10 $cm^3$ Amylalkohol aus. Die amylalkoholische Lösung wird spektroskopisch untersucht. Eine grüne Fluoreszenz entsteht, wenn man einige Tropfen einer alkoholischen Chlorzinklösung (1 *g* Chlorzink in 100 $cm^3$ ammoniakalischem Alkohol) zu der amylalkoholischen Lösung hinzufügt.

3. Nach *W. Schlesinger*[2]) erhält man selbst in urobilinarmen und an sonstigen Farbstoffen reichen Harnen unmittelbar schöne Fluorescenz und deutliche Absorptionsspektren, wenn man sie mit der gleichen Menge einer 10%igen Zinkacetatlösung in absolutem Alkohol versetzt und von dem entstehenden Niederschlag klar filtriert. Reine wässerige Urobilinlösungen geben die Reaktion noch in einer Verdünnung von 0·002%. Bei Gegenwart von viel Bilirubin ist die Beseitigung dieses nach *Bouma* erforderlich (siehe S. 852).

Fäzes werden zum Nachweis des Urobilins zuerst mit Äther entfettet, mit Säure enthaltendem Alkohol extrahiert, die Säure durch Ammoniak abgestumpft und das Reagens von *Schlesinger* zu gleichen Teilen zugesetzt. Oder man fügt das Reagens zu dem wässerigen Auszug der frischen Fäzes.

Nach *A. Schmidt* verreibt man 2—3 $cm^3$ große Brocken von frischen Fäzes in einer kleinen Porzellanschale mit wässeriger gesättigter Sublimatlösung, bringt die Masse in ein Uhrschälchen, läßt bedeckt stehen und prüft am nächsten Tage makroskopisch und mikroskopisch. Grüne Teile zeigen die Gegenwart von Bilirubin an, während urobilinhaltige Bestandteile sich rot färben.

Zum Nachweis des Urobilinogens in den Fäzes verreibt man nach *Neubauer*[3]) die Fäzes zur Entfernung des Indols und Skatols sorgfältig

---

[1]) *M. Nencki* und *A. Rotschy*, Zur Kenntnis des Hämatoporphyrins und des Bilirubins. Monatshefte d. Chem. Bd. **10**. S. 568 (1889).

[2]) *W. Schlesinger*, Deutsche med. Wochenschr. Bd. **29**. S. 561 (1903).

[3]) Vgl. *H. Thierfelder*, Handbuch. 8. Aufl. S. 740. *Neubauer*, Sitzber. d. Ges. d. Morph. u. Phys. München. Juli 1903.

mit Ligroin, zieht den Rückstand mit Alkohol aus, filtriert und fügt p-Dimethylaminobenzaldehyd (2%ige Lösung in 20% Salzsäure) hinzu. Die Lösung färbt sich sofort oder erst nach dem Kochen schön rot; spektroskopisch sieht man einen Streifen in Orange.

Bei der quantitativen Bestimmung des Urobilins verfährt man nach *G. Hoppe-Seyler*[1]) wie folgt:

100 *cm*³ Urin werden mit verdünnter $H_2SO_4$ angesäuert, mit Ammonsulfat gesättigt. Nach öfterem Umrühren und mehrstündigem Stehenlassen ausgeschiedene rote Flocken werden aufs Filter gebracht, mit konzentrierter Lösung von Ammonsulfat gewaschen, das Filter mit gleichen Teilen Alkohol und Chloroform in einem Kolben extrahiert. Diese Extrakte werden im Scheidetrichter mit Wasser versetzt, bis das Chloroform sich gut abscheidet und stehen gelassen, bis dieses ganz klar ist. Die Chloroformlösung wird dann durch ein kleines Filter filtriert, in gewogenem Becherglas auf dem Wasserbad langsam verdunstet, der Rückstand bei 100° getrocknet, mit etwas Äther extrahiert, filtriert, der Filterrückstand mit Alkohol wieder gelöst, wieder ins Becherglas gebracht, eingedampft, getrocknet, gewogen.

Um das Urobilin neben Urobilinogen nachzuweisen, wird nach *Saillet*[2]) 100 *cm*³ frisch gelassener, im Dunkeln gehaltener Harn mit 10 Tropfen Eisessig versetzt und mit dem gleichen Volumen Essigäther ausgeschüttelt. Der Essigäther wird mit wenig Wasser, das das vorhandene Urobilin aufnimmt, geschüttelt, das vorhandene Urobilinogen durch Stehenlassen der Essigätherlösung im Sonnenlichte in Urobilin übergeführt und dieses wieder nach Zusatz von etwas Essigsäure in Wasser aufgenommen.

In neuerer Zeit hat *D. Charnas*[3]) eine Methode zur Darstellung und quantitativen Bestimmung des Urobilins und Urobilinogens angegeben, die an Exaktheit die früheren überragen dürfte. Das Prinzip der Methode ist das folgende: Der urobilinhaltige Harn wird vergoren, angesäuert, ausgeäthert, die Urobilinogenlösung, wenn nötig, durch Petroläther von beigemengtem Farbstoff befreit. Dann wird das Urobilinogen entweder direkt mit Hilfe der *Ehrlich*schen Reaktion quantitativ bestimmt oder durch Belichtung in Urobilin übergeführt, dieses durch Aussalzen gereinigt und zur Wägung gebracht. Die genauen Vorschriften sind die folgenden: 500 oder 1000 *cm*³ des urobilinhaltigen frischen Harnes werden bis zum Eintritt der alkalischen Reaktion mit Ammoniumkarbonatlösung versetzt und 1—2 Tage lang im Brutofen belassen. Dann wird der Harn in einem sehr geräumigen, offenen Gefäße durch Zusatz einer gesättigten Weinsäurelösung stark sauer gemacht, ein etwa ausfallender Niederschlag schnell abgesaugt und die Flüssigkeit mit dem 1½- bis 2fachen Volumen Äther ausgeschüttelt. Die Ätherschicht wird wiederholt mit einem kleinen Volumen Wasser gewaschen. Ist diese stark gefärbt, so wird das gleiche Volumen

---

[1]) *G. Hoppe-Seyler,* Über die Ausscheidung des Urobilins in Krankheiten. *Virchows* Arch. Bd. **124**. S. 30 (1891).

[2]) l. c. nach *Spaeth,* Chemische und mikroskopische Untersuchungen des Harnes. 3. Aufl. 1908. S. 465.

[3]) *D. Charnas,* Über die Darstellung, das Verhalten und die quantitative Bestimmung des reinen Urobilins und des Urobilinogens. Biochem. Zeitschr. Bd. **20**. S. 401 (1909).

Petroläther hinzugefügt und der sich abscheidende Farbstoff durch wenig Wasser entfernt. In der nun nahezu farblosen ätherischen (bzw. ätherpetrolätherischen) Urobilinogenlösung kann das Urobilin entweder spektrophotometrisch oder gewichtsanalytisch bestimmt werden. Im ersteren Falle wird die Lösung in einem Meßzylinder abgemessen und zur Ermittlung des Extinktionskoeffizienten wie folgt verfahren: 1 oder 2 *cm*³ der ätherischen Lösung mischt man mit 0·2—0·5 *cm*³ einer kaltgesättigten ätherischen Lösung von Dimethylparaamidobenzaldehyd in einem 10 *cm*³ fassenden mit eingeschliffenem Stöpsel versehenen Meßzylinder, man fügt 2—3 Tropfen mit trockenem Salzsäuregas gesättigten absoluten Alkohol hinzu und schüttelt 2—3 Minuten kräftig. Dann wird sofort mit einer passenden Menge Alkohol verdünnt, die Lösung in einen ca. 3 *cm*³ fassenden *Schultze*schen Trog übertragen. Die Messung erfolgt im Bereich des dunkelsten Teiles des Absorptionsstreifens (λ 550—570). Die Berechnung erfolgt nach der Formel C = AE, wo E der Mittelwert des gefundenen Extinktionskoeffizienten, A = 0·000017 zu setzen ist; C ist g-Urobilinogen in 1 *cm*³ der ätherischen Lösung. Bei sehr geringem Urobilinogengehalt werden 10 *cm*³ der Ätherlösung im Meßzylinder mit 0·2—0·3 *cm*³ der gesättigten Aldehydlösung und 2—4 Tröpfchen der alkoholischen Salzsäure versetzt, zwei Minuten geschüttelt und eine passende Menge (mindestens 2 *cm*³) hinzugefügt; der ganze Farbstoff ist nun in der wässerigen Schicht enthalten. Das Verfahren gibt die Summe Urobilin + Urobilinogen, in Urobilin ausgedrückt; bei Weglassung des Gärungsvorganges gestattet es natürlich auch die isolierte Bestimmung des im Harne vorhandenen Urobilinogens. — Will man das Urobilin zur Wägung bringen, so fügt man zur ätherischen Urobilinogenlösung im Scheidetrichter etwa das gleiche Volumen reines Wasser und läßt einen Tag im direkten Sonnenlichte stehen. Die wässerige Urobilinlösung wird dann filtriert, mit reinstem Ammonsulfat in Substanz gesättigt, der Niederschlag auf einem dichten Filter gesammelt, lufttrocken und mit möglichst wenig absolutem Alkohol extrahiert, die filtrierte alkoholische Lösung über Phosphorpentoxyd im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet und der trockene Urobilinrückstand zur Wägung gebracht.

3. Urochrom. Der eigentliche Farbstoff des Harnes.

Darstellung.

1. Nach *Garrod.* 0·5—1 *l* Harn werden in gelinder Wärme mit Ammonsulfat gesättigt, das Filtrat mit absolutem Alkohol (2—3 Volumen absoluter Alkohol auf 10 Volumen salzgesättigtem Harn) versetzt. Den alkoholischen Auszug, der den Farbstoff enthält, gießt man in viel Wasser und sättigt wieder in gelinder Wärme, mit Ammonsulfat, worauf sich die alkoholische Farbstofflösung wieder abscheidet. Um diese von Wasser und Ammonsulfat zu befreien, gießt man die Lösung auf festes Ammonsulfat und erwärmt schwach; von den sich so bildenden zwei Schichten nimmt die untere das meiste vorher in Lösung gewesenen Ammonsulfats auf. Die aufschwimmende Lösung wird unter zeitweiligem Zusatz von Ammoniak zur Trockene ver-

dunstet, der braune Rückstand ein- oder zweimal mit Essigäther gewaschen und einige Stunden in verschlossener Flasche unter absolutem Alkohol stehen gelassen. Ein in Alkohol unlöslich gewordener Rest kann durch Auflösen in Wasser weiter, wie oben angegeben, wieder verarbeitet werden. Der alkoholische Auszug wird bis zur Orangefärbung eingeengt, in etwas mehr als sein Volumen Äther gegossen, der dabei amorph ausfallende Farbstoff auf einem mit Äther befeuchteten Filter gesammelt, mit Chloroform und absolutem Alkohol gewaschen.

2. Nach *H. Hohlweg* [1]) wird normaler Menschenharn mit Kalkmilch alkalisch gemacht, mit Chlorcalcium völlig ausgefällt, das Filtrat mit Salzsäure neutralisiert, im Vakuum zum Sirup eingeengt, der Sirup mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, mit Tierkohle mehrere Stunden geschüttelt, die auf einem Filter gesammelte Kohle mit heißem Wasser bis zur Chlorfreiheit gewaschen, auf Tonteller bei 40° getrocknet, mit Eisessig geschüttelt. Aus der Eisessiglösung wird der Farbstoff durch das zehnfache Volumen Äther gefällt. Der so gewonnene harzige Körper wird bei 40° getrocknet. Zur Extraktion des Farbstoffes aus der Kohle ist auch Methylalkohol brauchbar. Nach *K. E. Salomonsen* wird statt des Schüttelns mit Tierkohle der eingeengte Harn durch in ca. 5 *cm* breiten und 50 *cm* langen Glasröhren befindliche Tierkohle in langsamem Strome filtriert; die getrocknete Tierkohle dann in ähnlicher Weise durch einen langsamen Strom von Eisessig extrahiert, der Auszug im Vakuum bei 35—40° eingeengt, mit Äther gefällt.

Zur Isolierung aus dem Harn verfuhr *St. Dombrowski* [2]) wie folgt:

Der Harn wird behufs Entfernung der Schwefelsäure, der Phosphorsäure sowie der Harnsäure mit einer ammoniakalischen Lösung von Barium- und Calciumacetat gefällt (zu 10 *l* Harn wird eine Lösung von 86 *g* Calciumacetat, 53 *g* Bariumacetat und 43 $cm^3$ 21%ige $NH_3$ zugefügt); nach mehrstündigem Stehen enthält die Harnflüssigkeit weder Schwefel- noch Phosphorsäure und ist beinahe frei von Harnsäure. Nach Neutralisation des überschüssigen Ammoniaks mit Essigsäure wird das Filtrat mit einer Lösung von Kupferacetat versetzt, deren sauere Reaktion vorher mit Ammoniak abgestumpft war. Der bald entstehende amorphe, grünlichgraue Niederschlag wird nach 24 Stunden auf einem *Büchner*schen Filter gesammelt, sorgfältig mit Wasser ausgewaschen, in Wasser zerteilt und bei einer Temperatur von 50° mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Nach Vertreibung des Schwefelwasserstoffes im Vakuum in einer $CO_2$-Atmosphäre unter gelindem

---

[1]) *H. Hohlweg*, Zur Kenntnis des Urochroms. Biochem. Zeitschr. Bd. **13**. S. 199 (1908). — *K. E. Salomonsen*, Ebenda. S. 205; vgl. ferner: *W. Kramm*, Über ein neues Lösungsmittel der Harnfarbstoffe. Deutsche med. Wochenschr. S. 25 und 42 (1896); vgl. hierzu *St. Dombrowski*, Über das Uromelanin, das Abbauprodukt des Harnstoffs. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **62**. S. 358 (1909). — Über die Darstellung vgl. *Thudichum*, Brit. med. Journ. Jg. **1864**. II. p. 509; Journ. f. prakt. Chem. Bd. **104**. S. 2577.

[2]) *St. Dombrowski*, Über die chemische Natur des spezifischen Farbstoffs des Harns. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **54**. S. 188 (1907/8).

Erwärmen wird die gelblichrote Flüssigkeit mit einem kleinen Überschuß einer Barytlösung versetzt. Der dabei entstandene gelbe, flockige Niederschlag wird abfiltriert, der Barytüberschuß im Filtrat wird sofort mit Kohlensäure entfernt, die Flüssigkeit im Vakuum konzentriert und aus dem erhaltenen Sirup das Bariumurochromsalz mit starkem Alkohol in Form von amorphen Flocken gefällt.

Über eine quantitative Bestimmung des Urochroms vgl. *J. Browinski* und *St. Dombrowski.*[1])

Für eine Schätzung des Harnfarbstoffes bzw. des Urochroms hat *G. Klemperer*[2]) das folgende Verfahren vorgeschlagen. Der Harn wird mit Tierkohle bis zur Farblosigkeit behandelt, die Tierkohle mit Wasser gewaschen, wobei nur Indikan gelöst wird, getrocknet und mit Alkohol ausgezogen. Das alkoholische Extrakt wird nach *Garrod* weiter behandelt, indem man den Alkohol im Vakuum bei 40° abdestilliert, den Rückstand mit Wasser aufnimmt, wiederholt mit Ammonsulfat sättigt, wieder mit Alkohol auszieht, im Vakuum eindampft und nach der Konzentration das Urochrom mit Äther fällt. Die wässerigen Lösungen des Urochroms werden zur Bestimmung seiner Menge mit Lösungen von Echtgelb G verglichen. 0·1 *g* dieses Farbstoffes wird in 1 *l* Wasser gelöst und 5 *cm*³ davon auf 90 *cm*³ gebracht; die hellgelbe Färbung entspricht der von einer 0·1%igen Urochromlösung hervorgerufenen Farbentönung.

4. Urorosein.[3])

Entsteht aus dem Chromogen Indolessigsäure[4]) auf Zusatz von starker Salzsäure und ganz verdünnter Kaliumnitritlösung.

Das Chromogen wird nach *Staal*[5]) aus dem normalen Harn in folgender Weise isoliert: der Harn wird mit Ammonsulfat gesättigt, nachdem alle färbbaren Substanzen (Urobilin, Uroerythrin, Gallenfarbstoff, Hämatoporphyrin) niedergeschlagen sind, filtriert. Das Filtrat wird auf dem Wasserbad eingeengt und nach dem Erkalten vom ausgeschiedenen Ammonsulfat abgegossen. Der Harn wird mit etwas Essigsäure angesäuert, im Scheidetrichter mit Essigäther ausgeschüttelt, in welchen die Chromogene des

[1]) *J. Browinski* und *St. Dombrowski*, Sur une méthode de dosage de la matière colorante fondamentale des urines. Journ. Phys. Path. gén. T. **10**. p. 819 (1908). — Über Eigenschaften und Natur des Urochroms vgl. *St. Dombrowski*, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **54**. S. 188 (1907). — Vgl. auch *H. Liebermann*, Über stickstoff- und schwefelhaltige Säuren im Menschenharn. Ebenda. Bd. **52**. S. 128 (1907).

[2]) *G. Klemperer*, Die Messung des Harnfarbstoffs und ihre diagnostische Verwertbarkeit. Berl. klin. Wochenschr. Bd. **40**. S. 313 (1903).

[3]) *M. Nencki* und *N. Sieber*, Über das Urorosein, einen neuen Harnfarbstoff. Journ f. prakt. Chem. Bd. **26**. S. 333 (1882).

[4]) *Herter*, The relation of nitrifyingbacteria to the urorosein reaction of *Nencki* and *Sieber*. Journ. Bioch. Chem. Vol. **4**. p. 238 (1908); On indolacetic acid as the chromogen of the „urorosein" of the urine. Ebenda. p. 253; vgl. auch *L. C. Maillard*, Über das Chromogen des Skatolrotes. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 515 (1906).

[5]) *J. Ph. Staal*, Über das Chromogen des sogenannten Skatolrotes im normalen Menschenharn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 236 (1905).

Indigrotes und des Uroroseins übergehen. Der Essigäther wird durch Ausschütteln mit Wasser von Indikan befreit; man setzt das Auswaschen so lange fort, bis das Wasser mit Isatinsalzsäure nicht mehr reagiert. Darauf wird dem Essigäther das Chromogen des Uroroseins durch Ausschütteln mit Kalilauge entzogen und die alkalische Lösung zum Aufbewahren mit Essigsäure neutralisiert. Aus dem Essigätherextrakt läßt sich eine Magnesiumverbindung darstellen.

Nachweis.[1]) Nach Zusatz einer Säure (Salzsäure, Phosphorsäure, Schwefelsäure, schneller bei Salpetersäure) tritt Urorosein im Harn in der Kälte nach einigen Minuten (bei 70° schneller) auf. Am schnellsten entsteht das Urorosein beim Versetzen des Harnes mit Salzsäure und sehr wenig Chlorwasser oder Chlorkalk. Frei werdendes Indigo schüttelt man mit Chloroform aus, worin das Urorosein unlöslich ist. Der Farbstoff wird mit Amylalkohol extrahiert, der amylalkoholische Extrakt mit verdünnter Kalilauge oder mit Ammoniak geschüttelt. Der schwach gelbe amylalkoholische Auszug wird mit Salzsäure angesäuert, worauf die rote Farbe wieder zurückkehrt.

Darstellung des Uroroseins nach *Rosin*. Der Harn wird mit Bleizucker in Überschuß versetzt, das Filtrat mit $NH_3$ in Überschuß; es wird filtriert. Beide Niederschläge werden vereinigt, bei ca. 70° im Trockenschrank getrocknet und so oft mit absolutem Alkohol ausgezogen, bis Proben nach Zusatz von HCl und einer Spur von Chlorwasser oder Chlorkalklösung sich noch rot färben. Die vereinigten Alkoholauszüge werden mit $H_2S$ entbleit, filtriert, auf dem Wasserbad konzentriert. Man fällt in Fraktionen mit Äther. Zum Schluß verdunstet man die alkoholisch-ätherische Lösung auf dem Wasserbade, entfernt die Phenolkörper durch Extraktion des Rückstandes mit Äther, den Rückstand löst man in sehr wenig Alkohol und versetzt bis zur beginnenden Trübung (8—10fache Menge) mit Äther. Das Chromogen des Harnrosas kristallisiert in farblosen Nadeln aus. Ist leicht löslich in Wasser und Alkohol, unlöslich in Äther und Chloroform.

5. Uroerythrin (Purpurin).[2])

Bedingt die rote Farbe des Uratsedimentes.

Zur Darstellung sammelt man das Uratsediment auf einem Filter, löst es in Wasser unter mäßigem Erwärmen, fällt den Farbstoff aus der warmen wässerigen Lösung durch Sättigung mit Chlorammonium und wäscht den Niederschlag zur Entfernung des Urobilins mit gesättigter Ammon-

[1]) *H. Rosin*, Ein Beitrag zur Lehre von den Harnfarbstoffen. (Über das sogenannte Urorosein, Harnrosa.) Deutsche med. Wochenschr. Jg. **1893**. S. 51. — Bezüglich Urorosein vgl. auch *V. Arnold*, Über das Vorkommen eines dem Urorosein nahestehenden Farbstoffes in gewissen pathologischen Harnen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **61**. S. 240 (1909); ferner *A. Ellinger* und *A. Flamand*, Eine neue Farbstoffklasse von biochemischer Bedeutung. Ebenda. Bd. **62**. S. 276 (1909). Vgl. auch Bd. **2** dieses Werkes, S. 741 und 754.

[2]) *A. E. Garrod*, A contribution to the study of uroerythrin. Journ. of Phys. Vol. **17**. p. 439 (1894/5).

chloridlösung. Filter und Niederschlag digeriert man im Dunkeln mit warmem Alkohol, filtriert, verdünnt die Alkohollösung mit dem doppelten Volumen Wasser und schüttelt zur Entfernung des Hämatoporphyrins mehrmals mit Chloroform aus. Fügt man zur Farbstofflösung einen Tropfen Essigsäure und schüttelt wieder mit Chloroform, so nimmt dieses das Uroerythrin auf. Man wäscht die Chloroformlösung mit Wasser und läßt das Chloroform im Dunkeln bei mäßiger Temperatur verdunsten.

Zum Nachweis dienen folgende Eigenschaften:

Eine verdünnte alkoholische (oder amylalkoholische) Lösung zeigt eine rosa Farbe, die durch Licht schnell verblaßt; die Lösung fluoresziert auch nach Zusatz von Chlorzink und Ammoniak nicht; zeigt im Spektrum ein breites Doppelband zwischen D und E bis F. Bei der Lösung des reinen Farbstoffs bewirken konzentrierte Schwefelsäure eine karminrote, fixe Alkalien über Purpur und Blau schnell grün werdende Färbung.

Uroerythrinreicher Harn zeigt eine mattorangerote Färbung.

### 6. Hämatoporphyrin.[1])

#### Nachweis im Harn.

Eine kleine Menge (30—50 *cm*³) Harn wird mit einer Barytmischung (gleiche Volumina kalt gesättigter Barytlösung und 10%iger Bariumchloridlösung) vollständig ausgefällt, der abfiltrierte Niederschlag mehreremal mit Wasser, dann einmal mit absolutem Alkohol gewaschen, in einer Reibschale mit wenig absolutem Alkohol und 6—8 Tropfen Salzsäure zu einem dünnen Brei verrieben; man filtriert nach gelindem Erwärmen auf dem Wasserbad durch ein trockenes Filter und wäscht, wenn nötig, mit wenigen Kubikzentimetern absolutem Alkohol nach. Es ist zweckmäßig, nicht mehr wie 8—10 *cm*³ Alkoholauszug herzustellen. Bei Gegenwart von Hämatoporphyrin im Harn ist der Alkoholauszug rot gefärbt. Man prüft das Filtrat spektroskopisch. Das Spektrum zeigt in saurer Lösung einen Streifen vor D und einen zweiten breiten Streifen zwischen D und E. In ammoniakalischer Lösung sind vom roten bis zum violetten Ende des Spektrums vier Streifen.

Bei einem noch geringeren Gehalt an Hämatoporphyrin geht man zweckmäßig vom Bleiniederschlag aus. Der Harn wird mit basischem Bleiacetat völlig ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert, mehrmals mit Wasser, einmal mit Alkohol gewaschen, dann mit starkem salzsäurehaltigem Alkohol in der Reibschale verrieben, nach einigen Stunden filtriert. Das dunkelgefärbte Filtrat, ca. 30 *cm*³, wird mit Ammoniak neutralisiert, dann mit alkalischer Barytlösung vollständig ausgefällt und der Niederschlag wie oben behandelt.

---

[1]) *E. Salkowski*, Über Vorkommen und Nachweis des Hämatoporphyrins im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **15**. S. 286 (1891).

Bei dem Nachweis des Hämatoporphyrins nach *Garrod*[1]) wird der Harn (150—300 *cm*³ pathologischer, 200—1000 *cm*³ normaler Harn) mit Kali- oder Natronlauge (auf 100 *cm*³ Harn 20 *cm*³ 10⁰/₀ige Lauge) versetzt, (ist der Phosphatniederschlag gering [vorher prüfen], so wird er mit etwas in essigsaurem Wasser gelöstem Calciumphosphat versetzt), der Phosphatniederschlag, der den Farbstoff mitreißt, mit Wasser gewaschen, mit säurehaltigem Alkohol behandelt und die alkoholische Lösung spektroskopisch untersucht. Dann fügt man Ammoniak zu, bis eine neuerliche Phosphatfällung auftritt, säuert bis zur Lösung mit Essigsäure an und extrahiert das Hämatoporphyrin mit Chloroform aus. Das Chloroform zeigt das Spektrum des „alkalischen Hämatoporphyrins".

[1]) *A. E. Garrod,* On the occurrence and detection of haematoporphyrin in the urine. Journ. of Phys. Vol. **13**. p. 603 (1892); Haematoporphyrin in normal urine. Ebenda. Vol. **17**. p. 349 (1894/5); vgl. auch *O. Hammarsten,* Skand. Arch. Bd. **3**. S. 322 (1892) und *Neubauer-Vogel,* S. 557—581.

# Die Darstellung organischer Basen aus Harn.

Von **Fr. Kutscher**, Marburg.

Es ist mir die Aufgabe zugefallen, die Methoden zur Darstellung der organischen Harnbasen zu schildern, mit Ausnahme der zur Gewinnung des Kreatinins und der Purinbasen benutzten.

Die ersten Forschungen nach eigenartigen Harnbasen wurden wohl von *Selmi*[1]) 1880 im Anschluß an seine ausgedehnten Arbeiten über Leichenalkaloide angestellt. Es gelang ihm in der Tat, aus pathologischen, alkalisch gemachten Harnen durch Extraktion mit Alkohol und Ausschütteln mit Äther basische Substanzen zu gewinnen, die eine Reihe Alkaloidreaktionen gaben, zum Teil giftig wirkten und nicht mit Mono-, Di- oder Trimethylamin identisch waren. *Selmi* nannte die von ihm isolierten Körper Pathoamine.

Aber erst die Untersuchungen von *Bouchard*[2]) über die toxische Wirkung des Harns haben den Anstoß zu zahlreichen Arbeiten gegeben, die sich mit den toxischen Bestandteilen des Harns beschäftigten. Man ging dabei von der Voraussetzung aus, daß die die Giftigkeit des Harns bedingenden Körper basische, den Pflanzenalkaloiden ähnliche sein müßten. Zu ihrer Darstellung benutzte man deshalb hauptsächlich Verfahren, die sich eng den bei der Ausmittelung von Pflanzenalkaloiden gebräuchlichen anschlossen. Namentlich ist von *Luff*[3]) und *Griffiths*[3]) eine derartige Methode

[1]) *Selmi*, Anormale und zum Teil giftige Produkte pathologischer Harne, betrachtet in Beziehung zur Toxikologie und zur ärztlichen Diagnose. Annali di Chim. e di Farmacol. Vol. 8. p. 3. Jg. 1888. *Selmi* hatte seine Abhandlung am 16. Dezember 1880 der Accad. d. Scienze di Bologna vorgelegt. Dieselbe wurde dann 1888 gedruckt.

[2]) *Bouchard*, Experimentelle Untersuchungen über die Giftigkeit des normalen Harns. Compt. rend. de la Soc. d. Biol. Jg. **1884**. p. 665; Über die normal im Organismus existierenden Gifte und besonders über die Giftigkeit des Harns. Compt. rend. T. **102**. p. 727; Einfluß der Abstinenz, der Muskelarbeit und der komprimierten Luft auf die Schwankungen der Giftigkeit des Harns. Compt. rend. T. **102**. p. 1127. Jg. 1886. Siehe hierzu auch die Arbeiten von *B. Bocci*, Über giftige Wirkungen des menschlichen Harns. Zentralbl. f. d. med. Wissensch. Jg. **1882**. p. 929. Weiter: *G. Pouchet*, Untersuchungen über Ptomaine und analoge Verbindungen. Compt. rend. T. **97**. p. 1540. Jg. 1884.

[3]) *A. T. Luff*, Eine neue Methode zur Extraktion von Ptomainen. London 1888. — *Griffiths*, Ein aus Urin in einem Fall infektiöser Krankheit ausgezogenes Ptomain.

zur Gewinnung von Harnbasen ausgearbeitet worden. Sie lehnt sich dem bekannten Verfahren von *Stas-Otto* an. Mit Hilfe dieser Methode hat *Griffiths* aus pathologischen Harnen eine große Anzahl verschiedener Basen isolieren können. Die Angaben von *Griffiths* sind allerdings zum Teil nicht bestätigt worden, aber *Albu*[1]), der den bei verschiedenen Krankheiten abgesonderten Harn nach den von *Stas-Otto* und *Luff-Griffiths* beschriebenen Methoden sehr sorgfältig untersucht hat, konnte damit doch in der Tat toxische Körper von basischen Eigenschaften gewinnen.

Das Verfahren von *Luff-Griffiths* gestaltet sich mit den von *Albu* angegebenen Modifikationen folgendermaßen:

Wenigstens 8—10 *l* Harn werden, nachdem sie mit kohlensaurem Natron stark alkalisch gemacht sind, mit dem halben Volum Äther ausgeschüttelt. Schon eine einmalige Extraktion genügt nach *Albu*[1]), um die ätherlöslichen Basen in den Äther überzuführen. Man läßt absitzen, trennt die ätherische Schicht ab und entzieht ihr durch Schütteln mit 5%igem weinsauren Wasser das Alkaloid. Die wässerige weinsaure Lösung scheidet man vom Äther, vertreibt aus ihr den aufgenommenen Äther, macht sie wieder mit Natriumkarbonat alkalisch und entzieht ihr die in Freiheit gesetzten Basen durch Schütteln mit dem halben Volum Äther. Den Äther trennt man von der wässerigen Flüssigkeit, läßt ihn verdunsten und trocknet den Rückstand über Schwefelsäure. Die Basen bleiben kristallinisch zurück oder sind durch Umkristallisation aus Alkohol leicht rein zu erhalten. Durch Einengen des Harns vor der Ätherextraktion konnte die Ausbeute an Basen nicht gesteigert werden.

Die Methode ist natürlich nur auf die Darstellung ätherlöslicher Basen beschränkt, die Ausbeute scheint aber stets eine sehr geringe zu sein. *Albu*[1]) macht darüber folgende Angaben: (I) 3·5 *l* Harn von Diphtheriekranken gaben 29 *mg* Substanz, (II) 4·25 *l* Harn von Scharlachkranken lieferten 15·4 *mg* Substanz, (III) 6·5 *l* Harn eines Erysipelkranken gaben 24·7 *mg*, (IV) 8 *l* Harn eines Pneumonikers gaben 36 *mg*. Mit positivem Erfolg untersuchte *Albu*[1]) nach dieser Methode den Harn von Leuten, die an Scharlach, Masern, Pneumonie, Diphtherie, Phthisis pulmonum, Sepsis, Erysipel, Morbus Basedowii, Tetanie, perniziöser Anämie, Autointoxikation, Urämie, Coma diabeticum erkrankt waren. Dagegen ließ sich kein Alkaloid im Harn von Gesunden, bei Typhus abdominalis, puerperaler Sepsis, akutem Gelenkrheumatismus, Cholera, Eklampsie, Magenkarzinom, Tabes, Morbus Addisonii, Erythema nodosum nachweisen. Zur Analyse reichte sein Material in keinem Falle.

Weit erfolgreicher hatte *Griffiths* selbst gearbeitet. Er stellte aus dem Harn bei verschiedenen Krankheiten 15 organische Basen in solcher

Chem. news. Vol. **61**. p. 87. Jg. 1890; ferner: Ptomaine aus dem Urin in einigen Infektionskrankheiten. Compt. rend. T. **113**. p. 656. Jg. 1891.

[1]) *Albu,* Über die Darstellung von Toxinen aus dem Harn bei akuten Infektionskrankheiten; ferner: Über die Ausscheidung toxischer Substanzen bei akuten und chronischen Krankheiten. Berliner klin. Wochenschr. Bd. **31**. S. 8 u. 1081. Jg. 1894.

Menge dar, daß er ihre empirische Formel ermitteln, ihr Verhalten gegen die gebräuchlichen Alkaloidreagenzien festlegen und ihre Wirkung auf das Tier proben konnte. Da jedoch die Angaben von *Griffiths* durch die sorgfältige Nachprüfung von *Albu* [1]) eine starke Einschränkung erfahren haben, begnüge ich mich damit, die Formel der von *Griffiths* entdeckten Basen wiederzugeben:

1. $C_6H_{13}N_3O_2$ gefunden bei Bräune und Parotitis (Compt. rend. T. **113**, p. 656; Chem. news. Vol. **61**, p. 87).
2. $C_5H_{12}NO_4$ gefunden bei Scharlach (Compt. rend. T. **113**, p. 656).
3. $C_{14}H_{17}N_2O_6$ gefunden bei Diphtherie (Compt. rend. T. **113**, p. 656).
4. $C_3H_5N_3O$ (Glykocyamidin?) gefunden bei Masern (Compt. rend. T. **114**, p. 497).
5. $C_5H_{19}NO_2$ gefunden bei Tussis convulsiva (Compt. rend. T. **114**, p. 496).
6. $C_{15}H_{10}N_2O_6$ gefunden bei Rotz (Compt. rend. T. **114**, p. 1382).
7. $C_{20}H_{26}N_2O_3$ gefunden bei Pneumonie (Compt. rend. T. **114**, p. 1382).
8. $C_{12}H_{16}N_5O_7$ gefunden bei Epilepsie (Compt. rend. T. **115**, p. 185).
9. $C_{22}H_{19}NO$ gefunden bei Puerperalfieber (Compt. rend. T. **115**, p. 668).
10. $C_{11}H_{13}NO_3$ gefunden bei Erysipel (Compt. rend. T. **115**, p. 667; Bull. de la Soc. chim. [3.] T. **7**, p. 250).
11. $C_7H_{15}NO$ gefunden bei Ekzem (Compt. rend. T. **116**, p. 1205).
12. $C_9H_9NO_4$ gefunden bei Influenza (Compt. rend. T. **117**, p. 744).
13. $C_8H_5NO_5$ gefunden bei Karzinom (Compt. rend. T. **118**, p. 1350).
14. $C_5H_5N_2O_2$ gefunden bei Pleuritis (Chem. news. Vol. **70**, p. 199).
15. $C_{10}H_9NO_4$ gefunden bei Angina pectoris (Compt. rend. T. **120**, p. 1128).

Der normale Harn von Menschen und Tieren war frei von ätherlöslichen Basen.

Durch die Untersuchungen von *Albu* [1]) erreichten die Forschungen nach ätherlöslichen Harnalkaloiden einen gewissen Abschluß, denn seither hat man ausgedehntere Versuche in dieser Richtung nicht mehr angestellt. Es ist außerordentlich zu bedauern, daß man dieses Gebiet der Harnuntersuchung so lange hat brach liegen lassen, da die Körper, die *Griffiths* und *Albu* in der Hand gehabt haben, sicher das größte Interesse beanspruchen.

Nachdem das Verfahren von *Brieger* [2]) zur Darstellung der Fäulnisalkaloide bekannt geworden war, wurde es sinngemäß verändert auch auf den Harn gewandt.

2. Verfahren nach *Brieger*. Größere Mengen Harn (nicht unter 10 *l*) werden mit Salzsäure schwach angesäuert und bei mäßiger Wärme zum

[1]) *Albu*, Über die Darstellung von Toxinen aus dem Harn bei akuten Infektionskrankheiten; ferner: Über die Ausscheidung toxischer Substanzen bei akuten und chronischen Krankheiten. Berliner klin. Wochenschr. Bd. 31. S. 8 u. 1081. Jg. 1894.

[2]) *Brieger*, Die Ptomaine. Berlin 1885/1886. 3 Teile. Berlin. Verlag August Hirschwald.

Sirup eingedampft. Den Sirup zieht man mit Alkohol aus, verdunstet den Alkohol und nimmt den aus der alkoholischen Lösung verbliebenen Rückstand nochmals mit Alkohol auf. Die neue klar filtrierte Lösung wird mit gesättigter, alkoholischer Sublimatlösung gefällt. Die Fällung wird abgesaugt, mit alkoholischer Sublimatlösung gewaschen, in heißem Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber liefert beim Einengen die Chlorhydrate der Basen. Dieselben sind eventuell durch Umfällung mit Phosphorwolframsäure oder Phosphormolybdänsäure zu reinigen.

Mit Hilfe dieses Verfahrens hat *Albu*[1]) bei einem Fall von Tetanie 0·5 *g* eines weißen Chlorhydrates gewonnen, welches schön kristallisierende Gold- und Platinsalze lieferte sowie die meisten Alkaloidreaktionen gab.

*Ewald*[2]) und *Jacobsohn* haben sich des gleichen Verfahrens bedient. Sie erhielten damit in einem Fall von Morbus Addisonii aus dem Harn eine Base, die ein gut kristallisierendes, einheitliches, in Wasser schwer lösliches Pikrat gab. Für das Pikrat ließ sich die Formel

$$C_5 H_7 NO_6 . C_6 H_2 (NO_2)_3 . OH$$

berechnen. Nähere Angaben über die Eigenschaften des Pikrats fehlen.

Bezüglich des *Brieger*schen Verfahrens habe ich einige Erfahrungen sammeln können, über die ich hier berichten möchte. Von Herrn *Arnt Kohlrausch*[3]) sind auf meine Veranlassung Untersuchungen über das Verhalten von Betain, Methylpyridylammoniumhydroxyd und Trigonellin im tierischen Organismus angestellt worden. Die Chloride der drei genannten Basen sind durch alkoholische Sublimatlösung fällbar. Es sollte namentlich festgestellt werden, ob die verfütterten Basen mit dem Harne wieder ausgeschieden werden. Zu diesem Zwecke wurde der durch Kieselgur abgesaugte Harn mit Salzsäure angesäuert, zum Sirup eingeengt und der Rückstand beim Betain- sowie Trigonellinharn zunächst mit Methylalkohol aufgenommen, da die Chloride des Betains und Trigonellins in Äthylalkohol schwer löslich sind. Die methylalkoholische Lösung wurde filtriert, der Methylalkohol verdunstet, der Rückstand mit Äthylalkohol aufgenommen, die äthylalkoholische Lösung auf dem Wasserbade zum Sieden erhitzt, dann durch Eintragen von festem, feingepulvertem Sublimat mit diesem Fällungsmittel gesättigt. Das Ganze blieb einige Tage in der Wärme, dann in der Kälte stehen. Die ausgeschiedenen Sublimatverbindungen wurden abgesaugt, mit alkoholischer Sublimatlösung gewaschen, in Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die so gewonnenen Chloride wurden mit Tierkohle „Merck" entfärbt. Nach einer weiteren Reinigung mit Methyl- resp.

[1]) *Albu,* l. c.

[2]) *Ewald* und *Jacobsohn*, Über ptomainartige Körper im Harn bei chronischen Krankheitsprozessen. Berliner klin. Wochenschr. Bd. 31. S. 25. Jg. 1894.

[3]) *A. Kohlrausch,* Das Verhalten einiger physiologisch wichtiger Substanzen im tierischen Organismus. Sitzungsberichte d. Ges. z. Bef. d. ges. Naturwissenschaften. S. 169 Marburg 1908.

Äthylalkohol lieferten sie dann ohne weiteres die schwer löslichen, gut kristallisierenden Goldverbindungen. Auf diese Weise konnte Herr *Kohlrausch* den Nachweis führen, daß das Betain auch den Organismus des Kaninchens zum Teil unzersetzt passiert, während man bisher annahm, daß der Pflanzenfresser verfüttertes Betain ganz zerstört. Also die Methode hatte sich in diesen Versuchen gut bewährt, aber unter zwei Bedingungen. Zunächst ist es für das Gelingen des Versuches absolut notwendig, daß die alkoholische, zu fällende Flüssigkeit mit Sublimat gesättigt wird und zweitens dürfen die gesuchten Basen nicht zu sehr gegen die anderen Harnbestandteile zurücktreten. Solange nämlich Herr *Kohlrausch* mit kleinen Versuchstieren (Katzen, Hunden) arbeitete, die für ihre Körpergröße beträchtliche Dosen der oben genannten Basen erhalten hatten, arbeitete die Methode ganz nach Wunsch. Als er aber die Versuche auch am Menschen anstellte, der auf die Gewichtseinheit viel weniger an Betain etc. erhielt, versagte das Verfahren. Die schwer löslichen Sublimatverbindungen des Betains etc. schlugen sich hier nicht nieder, sie wurden durch die anderen Harnbestandteile in Lösung gehalten.

Danach ist das sonst so brauchbare *Brieger*sche Verfahren zum Aufsuchen von Harnbasen mit Vorsicht zu verwenden und ein Erfolg nur unter günstigen Umständen zu erwarten. Fahndet man mit ihm auf bisher unbekannte Harnbasen, so hat man außerdem stets damit zu rechnen, daß ein großer Teil der organischen Basen sich überhaupt nicht in wässeriger oder alkoholischer salzsaurer Lösung mit Sublimat zu schwer löslichen Verbindungen vereinigen wird. So sehen wir denn auch, daß zum Nachweis des Tetra- und Pentamethylendiamins zweier Basen, die uns recht eigentlich durch die *Brieger*sche Methode zuerst zugänglich geworden sind, das Verfahren von *Baumann* und *Udránsky* gewählt wird, wenn wir die beiden Diamine aus dem Harn darstellen sollen.

Verfahren von *Baumann*[1]) und *Udránsky*. Dasselbe besteht in der Überführung der beiden Diamine in die Benzoylverbindungen. Dazu werden 1500 $cm^3$ Harn mit 200 $cm^3$ Natronlauge von 10% sowie 20—25 $cm^3$ Benzoylchlorid versetzt und geschüttelt, bis der Geruch nach Benzoylchlorid verschwunden ist. Die Benzoesäureäther der Diamine scheiden sich als gelbliche, undeutlich kristallinische Niederschläge neben Phosphaten sowie den Benzoylverbindungen der normalen Kohlehydrate ab. Nach mehrtägigem Stehen werden dieselben abfiltriert, mit Wasser gewaschen, bis dasselbe klar abläuft, in Alkohol gelöst und die Lösung nach dem Einengen auf ein kleines Volumen in die 30fache Menge Wasser gegossen. Die sich allmählich ausscheidende Kristallisation wird nach mehrtägigem Stehen abfiltriert, mit Wasser gewaschen, bis dasselbe klar abläuft. Die milchige Trübung, die man an der Mutterlauge und dem ersten Waschwasser beobachten kann, ist durch die Benzoylverbindungen der Kohlehydrate verursacht.

---

[1]) *Baumann* und *L. v. Udránsky*, Über das Vorkommen von Diaminen, sogenannten Ptomainen, bei Cystinurie. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13. S. 564. Jg. 1889.

Die auf dem Filter gebliebenen Kristalle werden wieder in möglichst wenig Alkohol gelöst. Aus der Lösung scheidet man sie durch Verdünnen mit Wasser ab. Durch eine Schmelzpunktbestimmung wird festgestellt, ob die ausgefallenen Kristalle nur aus Dibenzoylputrescin resp. Dibenzoylkadaverin bestehen oder ob ein Gemenge der beiden Benzoylverbindungen vorliegt. Ist dieses der Fall, so werden die Kristalle nochmals mit möglichst wenig warmem Alkohol aufgenommen und in die 20fache Menge Äther eingegossen, aus welchem die Benzoylverbindung des Putrescins beim Abkühlen auskristallisiert (Schmp. 176°), während diejenige des Kadaverins in Lösung bleibt und erst nach dem Verdunsten des Äthers in Kristallen gewonnen wird (Schmp. 130°). Die Trennung der beiden Verbindungen läßt sich so fast ohne Verlust bewirken.

Da die Löslichkeit der Benzoylverbindungen in Wasser eine sehr geringe ist, scheidet man die beiden Diamine nach der Methode von *Baumann* und *Udránsky* bereits im ersten Niederschlag fast vollständig ab. Um aber auch die in Lösung gebliebenen Reste noch aus dem Harn zu erhalten, säuert man den Harn stark mit Schwefelsäure an und schüttelt ihn mehrfach mit Äther aus. Der Äther wird verdunstet, der Rückstand mit Natronlauge alkalisch gemacht und zur Kristallisation in die Kälte gestellt. Nach 24 Stunden saugt man die ausgeschiedenen Kristalle ab, wäscht sie mit kaltem Wasser, löst die zurückbleibenden Benzoyldiamine in wenig Alkohol, scheidet sie daraus durch viel Wasser ab und vereinigt sie mit der Hauptmenge.

Lösten *Baumann* und *v. Udránsky*[1]) einen Teil Putrescin in 10.000 Teilen Harn, so vermochten sie mit dieser Methode noch 60% der Base wiederzugewinnen. Für die Darstellung der beiden Diamine eignet sich die Methode von *Baumann* und *v. Udránsky* danach ausgezeichnet, die anderen Harnbasen verhalten sich ihr gegenüber aber recht spröde. *Albu*[2]) erhielt bei seinem Suchen nach Harnbasen mit der gleichen Methode niemals einen positiven Befund, wenn er überhaupt einen kristallinischen Rückstand erhielt, erwies er sich als Benzamid. Weiter arbeiteten *Kerry* und *Kobler*[3]) in der gleichen Weise wie *Baumann*. Von ihnen wurde der Harn bei Pneumonie, Pyämie, Typhus, Tuberkulose und Diphtherie benzoyliert. Sie erhielten auch stärkere Niederschläge als mit normalem Harn, aber dieselben reichten nicht zur Identifizierung der Benzoylverbindungen aus. Die Versuche von *Albu*[2]), *Kerry* und *Kobler*[3]) scheinen danach das Verfahren von *Baumann* und *v. Udránsky* auf die Gewinnung des Penta- und Tetramethylendiamins zu beschränken.

Verfahren von *Loewy* und *Neuberg*[4]). Mit Erfolg sind *Loewy* und *Neuberg* in anderer Weise vorgegangen, um ebenfalls das Penta-

[1]) *Baumann* und *L. v. Udránsky*, l. c.

[2]) *Albu*, l. c.

[3]) *Kerry* und *Kobler*, Über das Verhalten der Harne bei Infektionskrankheiten gegen Benzoylchlorid. Wiener klin. Wochenschr. S. 525. Jg. 1891.

[4]) *A. Loewy* und *C. Neuberg*, Über Cystinurie (I. Mitteilung) und Zur Kenntnis der Diamine. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **43**. S. 338 und 355. Jg. 1904/05.

und Tetramethylendiamin zu isolieren, das ein Cystinuriker nach Verfütterung von Lysin und Arginin ausschied. Sie sammelten den nach Lysindarreichung ausgeschiedenen Harn (2940 *cm*³), befreiten ihn vom ausgeschiedenen Cystin, säuerten ihn mit Schwefelsäure schwach an und fällten mit Phosphorwolframsäure. Der ausgewaschene Niederschlag wurde mit Baryt zerlegt, der überschüssige Baryt durch $CO_2$ entfernt. Die eingeengte Basenlösung versetzten sie mit Natronhydrat. Sie fügten dann der Flüssigkeit tropfenweise Phenylisocyanat zu, jeder Tropfen des einfallenden Isocyanats hatte unter deutlicher Erwärmung die sofortige Abscheidung eines voluminösen Niederschlages zur Folge. Als sich dessen Menge auf erneuten Cyanatzusatz nicht mehr vermehrte, wurde er abfiltriert. Durch seine fast völlige Unlöslichkeit, selbst in siedendem Alkohol, zeigte sich, daß er nicht aus Diphenylharnstoff bestand. Als einziges brauchbares Lösungsmittel erwies sich Pyridin, woraus die Verbindung auf vorsichtigen Zusatz von Wasser in schneeweißen Kristallen ausfiel. Nach nochmaliger Wiederholung dieses Verfahrens besaßen die Kristalle den konstanten Schmelzpunkt 207°. Sie bestanden aus Diphenylcyanatpentamethylendiamin:

$$C_6H_5 . HN . CO . NH . CH_2 - (CH_2)_3 - CH_2 . NH . CO . NH . C_6H_5.$$

In ganz analoger Weise ließ sich aus dem Harn nach Verfütterung von Arginin das Diphenylcyanattetramethylendiamin vom Schmelzpunkt 238—240° gewinnen.

Liegen Gemische von Penta- und Tetramethylendiamin vor, so ist eine Trennung derselben durch die Phenylharnstoffderivate ebenfalls möglich. Fügt man zu einer nach dem Abkühlen gerade gesättigten Lösung der trockenen Phenylcyanatverbindungen in Pyridin wasserfreies Aceton, so fällt momentan das Tetramethylenderivat aus, während die Pentamethylenverbindung sich erst bei mehrstündigem Stehen aus dem Filtrat abscheidet. Beide Fraktionen können durch nochmaliges Umkristallisieren weiter gereinigt werden.

Die bisher geschilderten Methoden gestatten nur aus einzelnen pathologischen Harnen organische Basen darzustellen. Alle Versuche, die damit von kritischen Beobachtern an normalen Harnen ausgeführt wurden, führten zu negativen oder zweifelhaften Resultaten. Erst in den letzten Jahren ist es gelungen, besondere Verfahren auszuarbeiten, die erlauben, den Nachweis zu führen, daß auch mit dem normalen Harn, und zwar regelmäßig organische Basen, abgesehen vom Kreatinin und den Purinbasen, ausgeschieden werden. Die gewonnenen Basen besitzen zum Teil auch toxische Eigenschaften, womit scheinbar die Theorie *Bouchards* über die toxische Wirkung des Harns eine weitere Stütze erhält, doch möchte ich auf die Giftigkeit der namentlich von *Lohmann*, *Achelis*, *Engeland* und mir aus normalem Harn isolierten Basen keinen besonderen Nachdruck legen. Viel wichtiger sind die Fragen nach ihrer Herkunft und die Beziehungen zum Stoffwechsel. Die Verfahren zur Darstellung der normalen Harnbasen gestalten sich verschieden, je nachdem man eine einzelne oder mehrere der

Basen darzustellen beabsichtigt. Ich will zunächst ein Verfahren angeben, das gestattet, die meisten der bisher bekannt gewordenen Harnbasen zu isolieren.

Verfahren von *Kutscher* und *Lohmann*[1,2,3]). Es werden 100 *l* normaler, spermatozoenfreier Frauenharn sorgfältig durch mit Kieselgur bedeckte Nutschen abgesaugt, um die Bestandteile der Nubekula zu entfernen. Das Filtrat wird mit konzentrierter Salzsäure versetzt, bis es ungefähr 3% freie Salzsäure enthält, und mit einer nach *Drechsels* Vorschrift bereiteten Phosphorwolframsäure gefällt, bis eine Probe auf Zugabe von Phosphorwolframsäure 1 Minute klar bleibt. Den reichlichen Niederschlag läßt man 24—48 Stunden absetzen, filtriert ihn ab, wäscht ihn mit 5%iger Schwefelsäure chlorfrei, schwemmt ihn in Wasser auf und zersetzt ihn mit heißer gesättigter Barytlösung. Man muß dafür Sorge tragen, daß sich die ganze Flüssigkeit dabei nicht über 30° erwärmt. Die in Freiheit gesetzten Basen werden abgesaugt, die Bariumwolframate werden sorgfältig gewaschen und 3mal ausgekocht. Die Spülflüssigkeit fügt man dem ersten Filtrat zu, befreit das Ganze durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt und engt die stark angeschwollene Flüssigkeit auf 1 *l* ein. Die alkalisch reagierende Masse säuert man mit ausgekochter Salpetersäure an, bis Kongo schwach gefärbt wird. Jetzt kann ein Teil des Urochroms, das ja mit in die Phosphorwolframfällung geht, in harzigen Flocken sich ausscheiden. Man filtriert und versetzt die geklärte Flüssigkeit mit 20%iger Silbernitratlösung, so lange ein Niederschlag ausfällt. Derselbe besteht aus den Silbernitratverbindungen der Purinbasen, die man auf diese Weise bis auf Spuren abscheiden kann. Nach 12 Stunden saugt man den Niederschlag ab. Will man ihn untersuchen, dann braucht man ihn nur einige Tage in schwache Ammoniaklösung zu bringen. Man führt dadurch die Silbernitratverbindungen der Purinbasen in ihre Silberverbindungen über, die sich nach dem Verfahren von *Krüger* und *Salomon* verarbeiten lassen.

Das Filtrat vom Purinbasenniederschlag versetzt man weiter mit 20%iger Silbernitratlösung, bis eine Probe, in gesättigtes Barytwasser gebracht, einen sich sofort bräunenden Niederschlag fallen läßt. Danach scheidet man durch vorsichtige Zugabe von kalt gesättigtem Barytwasser unter Kontrolle von ammoniakalischer Silberlösung (die ammoniakalische Silberlösung bereitet man sich, indem man 10%ige Silbernitratlösung mit 10%iger Ammoniaklösung versetzt, bis sich der zunächst ausfallende Niederschlag von Silberoxyd gerade gelöst hat; dann fügt man noch einen Tropfen Ammoniak zu) diejenigen Verbindungen ab, die sich auch durch

[1]) *Kutscher* und *Lohmann*, Der Nachweis toxischer Basen im Harn. I. u. II. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **48**. S. 1 und 422. Jg. 1906.

[2]) *Kutscher* und *Lohmann*, Der Nachweis toxischer Basen im Harn. III. Mitteilung und Bemerkung zur I. Mitteilung „Der Nachweis toxischer Basen im Harn". Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **49**. S. 81 und 88. Jg. 1906.

[3]) *Kutscher*, Der Nachweis toxischer Basen im Harn. IV. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **51**. S. 457. Jg. 1907.

Silbernitrat und Ammoniak fällen lassen. Von derartigen Verbindungen kommen beim Harn, so weit sich zurzeit sehen läßt, Substanzen mit dem Imidazolkern (Imidazolaminopropionsäure etc.) und das Kreatinin in Betracht. Bezüglich der Technik, die bei Erzeugung dieses Niederschlages zu beachten ist, bemerke ich folgendes: Nachdem man sich an einer kleinen Probe der von Purinbasen freien Flüssigkeit überzeugt hat, daß dieselbe auf vorsichtige Zugabe von Ammoniak eine weiße, in überschüssigem Ammoniak und in Salpetersäure lösliche Fällung liefert, versetzt man die ganze Flüssigkeit mit kleinen Portionen kalt gesättigten Barytwassers. Den Niederschlag, der danach sich bildet, läßt man absitzen. Von der darüber stehenden Flüssigkeit bringt man einen Tropfen auf eine Glasplatte und läßt ihn hier mit einem Tropfen ammoniakalischer Silberlösung, deren Darstellung oben angegeben ist, zusammenlaufen. Zeigt sich an der Berührungsstelle der beiden Flüssigkeiten nur mehr eine schwache oder keine Trübung, so ist die Fällung der auch durch Silbernitrat und Ammoniak abscheidbaren Körper beendigt.

Die Verarbeitung dieses Niederschlages (ich nenne ihn Silberniederschlag II) geschieht in folgender Weise: Er enthält hauptsächlich Kreatinin, das uns nicht interessiert und zu beseitigen ist. Zu diesem Zweck verreibt man den Niederschlag mit kaltem gesättigten Barytwasser. Dadurch wird schon ein großer Teil des Kreatininsilbers, das in gesättigtem Barytwasser nicht beständig ist, zersetzt; den Rückstand saugt man ab, löst ihn in verdünnter Salpetersäure und schlägt ihn durch Sättigung mit festem, gepulvertem Baryt nieder. Diese Lösung und Fällung ist eventuell noch ein- oder zweimal zu wiederholen. Die so restierenden Silberverbindungen enthalten die Hauptmasse der die Diazoreaktion gebenden Basen. Man kann sie nach bekannten Methoden auf Histidin verarbeiten. Dazu löst man den kreatininfreien Silberniederschlag in Salpetersäure, fügt noch etwas Silbernitrat dazu und fällt vorsichtig mit Ammoniak. Die flockige Fällung saugt man ab, wäscht sie gut aus, zersetzt sie mit Salzsäure und versucht die Chloride kristallinisch zu gewinnen. Zuweilen ist eine Reinigung über die Kadmiumverbindungen mit folgender Überführung in die Pikrolonate nötig, um zu kristallisierbaren Körpern zu kommen. Für gewöhnlich macht diese Fraktion die größten Schwierigkeiten. Einmal ist von *Engeland* Histidin, ein anderes Mal Imidazolaminoessigsäure aus dem Harn statt Histidin gewonnen worden. Daneben finden sich aber noch andere wenig untersuchte Imidazolderivate, die mit dem Histidin die Eigenschaft teilen, durch Silbernitratlösung und Ammoniak niedergeschlagen zu werden.

Das Filtrat von Silberniederschlag II wird mit Barytwasser weiter versetzt, so lange noch ein Niederschlag entsteht. Ein Überschuß an Barytwasser ist sorgfältig zu vermeiden. Der neue Niederschlag, den ich Silberniederschlag III nenne, enthält die Reste des Kreatinins, Basen, welche starke Diazoreaktion geben, über die wir aber sonst nichts weiter wissen, und schließlich Methylguanidin resp. Dimethylguanidin. Um die beiden letzten Basen zu gewinnen, geht man wohl am besten nach den Angaben

von *Achelis*[1]) vor. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit gesättigtem Barytwasser gewaschen, in verdünnter Schwefelsäure gelöst. Die Lösung wird mit $H_2S$ zersetzt, das Filtrat vom Schwefelsilber durch Baryt von der überschüssigen Schwefelsäure durch $CO_2$ vom Baryt befreit und eingeengt. Die mit einigen Tropfen Schwefelsäure neutralisierte Lösung wird mit wässeriger Pikrolonsäure geprobt. Sollte keine Fällung eintreten, so reinigt man das Methylguanidin, indem man es nochmals mit Silbernitrat und Baryt unter Kontrolle von ammoniakalischer Silberlösung fraktioniert ausfällt, und aus der Silberverbindung wieder die freie Base, wie oben angegeben, gewinnt. *Achelis* hat diese Reinigung immer vornehmen müssen, während es *Lohmann* und mir zweimal sofort glückte, das Methylguanidin in Gemeinschaft mit Dimethylguanidin als Pikrolonat zu isolieren. Eine brauchbare Methode, um Methyl- und Dimethylguanidin voneinander zu trennen, besitzen wir bisher nicht.

Das Filtrat von Silberniederschlag II befreit man durch Salzsäure vom Silber, durch Schwefelsäure vom Baryt, säuert es mit Schwefelsäure an und fällt den Basenrest wieder mit Phosphorwolframsäure aus. Nach 24 Stunden saugt man die Phosphorwolframate ab, wäscht sie mit $5^0/_0$iger Schwefelsäure frei von Salpeter- und Salzsäure. Darauf stellt man aus dem Niederschlage durch vorsichtige Zersetzung mit Baryt nach bekannter Methode wieder die freien Basen dar, deren Lösung man nach Entfernung des überschüssigen Baryts mit Salzsäure bis zur Reaktion gegen Kongo ansäuert. Man dampft sie bis zur beginnenden Kristallisation auf dem Wasserbade ein. Nach dem Erkalten zieht man den Rückstand mit absolutem Äthylalkohol aus, verdunstet die äthylalkoholische Lösung bei mäßiger Temperatur, nimmt das Zurückgebliebene wieder mit Äthylalkohol auf, und wiederholt diese Operation so oft, bis man die Basen in einen in Äthylalkohol glatt löslichen und einen darin unlöslichen resp. schwer löslichen Anteil getrennt hat.

Der letztere besteht der Hauptsache nach aus Kaliumchlorid, etwas Ammoniumchlorid und salzsaurem Kreatinin, denn man kann das Kreatinin durch seine Silberverbindung nicht ganz niederschlagen, da dieselbe etwas löslich in Wasser ist. Deshalb findet sich auch in dieser Fraktion noch etwas Kreatinin. Es könnten darin allerdings auch noch andere Harnbasen stecken, deren Chloride in kaltem Äthylalkohol schwer löslich sind wie das Betain und Trigonellin. Beide finden sich in zahlreichen Pflanzen und können, wie ich selbst gesehen habe, den Tierkörper passieren. Vom Betain wird denn auch in vielen Lehrbüchern (ich zitiere als Beispiel die letzte Ausgabe von *Beilsteins* Handbuch) angegeben, daß *Liebreich*[2]) es im Harn aufgefunden habe. Sieht man aber die Originalabhandlung genauer an, dann stellt sich diese Zitation als unrichtig heraus. Denn *Liebreich*

[1]) *Achelis*, Über das Vorkommen von Methylguanidin im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **50**. S. 10. Jg. 1906/07.

[2]) *Liebreich,* Über die Oxydation des Neurins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **2**. S. 12. Jg. 1869.

behauptet gar nicht, aus dem Harn Betain, sondern nur eine dem Cholin ähnliche Base dargestellt zu haben. Was für eine Substanz *Liebreich* wirklich in der Hand gehabt hat, ist aus seinen Angaben nicht zu erschließen, da er mit derselben keine Analysen, nicht einmal qualitative Reaktionen gemacht hat. Auch über die Methode, mit der er die fragliche Base dargestellt hat, sagt er nichts.

Um den Verlust derartiger Basen zu vermeiden, digeriert man den in Äthylalkohol unlöslichen Rückstand mit Methylalkohol, der meiner Erfahrung nach die Chloride aller in Betracht kommenden Basen, allerdings auch das salzsaure Kreatinin leicht löst, während das Kaliumchlorid ungelöst zurückbleibt. Die methylalkoholische Lösung verdunstet man, den Rückstand probt man mit den verschiedenen Alkaloidreagenzien auf eigenartige organische Basen. Ich möchte aber gleich einschalten, daß ich beim normalen menschlichen Harn nur Kreatinin erhalten habe.

Die in Äthylalkohol löslichen Chloride fällt man mit alkoholischer 20%iger Platinchloridlösung vollkommen aus. Den reichlichen, flockigen Niederschlag läßt man absitzen, filtriert ihn ab, wäscht ihn mit absolutem Alkohol und kristallisiert ihn aus verdünnter Salzsäure um. Beim Einengen scheidet sich etwas Kalium- und Ammoniumplatinchlorid ab. Die übrigen Platinate scheinen sich gegenseitig in Lösung zu halten, sie sind zur weiteren Trennung der Harnbasen nicht recht geeignet. Man beseitigt deshalb nach Entfernung des Kalium- und Ammoniumplatinates das Platin durch Schwefelwasserstoff. Die Lösung der so gewonnenen Chloride engt man zum Sirup ein, den man mit 30%iger wässeriger Goldchloridlösung behandelt. Nach vollkommener Ausfällung läßt man das Ganze einige Tage stehen, gießt die Mutterlauge von dem Niederschlag ab, löst denselben in heißer, verdünnter Salzsäure und engt die Lösung der Aurate bei einer 70° nicht übersteigenden Temperatur ein. Schon aus der heißen Flüssigkeit scheiden sich die kräftigen, sehr schwer löslichen Nadeln des Aurates vom Methylpyridylammoniumhydroxyd aus. Beim weiteren Einengen kann das Aurat einer zweiten Base des „Gynesins" daneben auskristallisieren. Um die beiden Aurate voneinander zu trennen, gingen *Lohmann* und ich in folgender Weise vor.

Das Gemenge der gesamten Aurate wurde auf ca. 100 $cm^3$ eingeengt und einige Tage leicht bedeckt in der Kälte stehen gelassen, bis sich die Kristalle nicht mehr zu vermehren schienen. Die Kristalle saugten wir ab, sie bestanden der Hauptsache nach aus den Auraten des Methylpyridylammoniumhydroxyds und des Gynesins, lösten sie in verdünnter, heißer Salzsäure und engten bei ca. 70° auf 150 $cm^3$ ein. Dabei schied sich das Aurat des Methylpyridylammoniumhydroxyds, das auch in der Wärme schwer löslich ist, ziemlich vollständig ab. Als wir die so weit eingeengte Flüssigkeit heiß filtrierten, blieb das eben genannte Aurat auf dem Filter.

Die Mutterlauge davon lieferte beim weiteren Abdunsten das Aurat des Gynesins, das in der Wärme leicht, in der Kälte schwer löslich ist. Durch Umkristallisieren war es von den Resten des anderen Aurates zu befreien.

Nach Beseitigung dieser schwer löslichen, gut kristallisierenden Aurate dampft man ihre Mutterlauge, die die leichter löslichen Aurate enthält, stark ein, die Aurate fallen als Öl aus. Man kann nun einige Zeit warten, ob das Öl nicht kristallisieren will, anderntalls kommt man in folgender Weise zu gut analysierbaren Verbindungen. Man löst das Öl in verdünnter Salzsäure, entfernt das Gold mit Schwefelwasserstoff, engt die Chloride zu Sirup ein und nimmt mit kaltem, absolutem Alkohol auf. Es kann nun ein

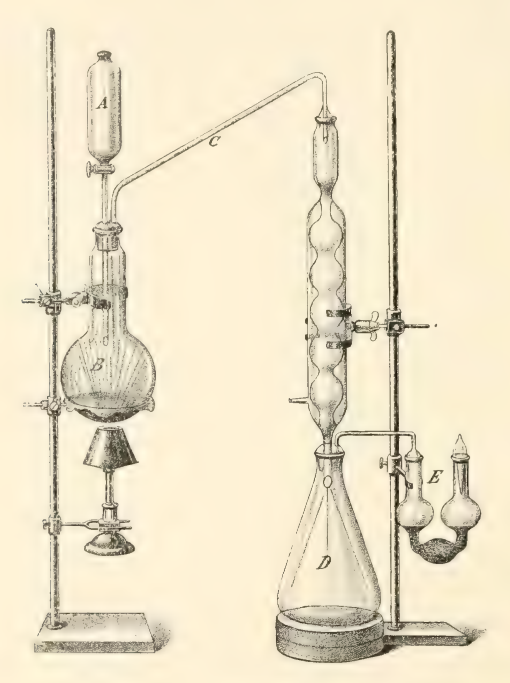



Fig. 270.

Teil als in Alkohol schwer lösliches Chlorid zurückbleiben, das man natürlich sofort wieder in das Aurat umwandeln kann. So habe ich das Chlorid und Aurat einer von mir „Mingin“ bezeichneten Base erhalten.

Die alkohollöslichen Chloride fällt man mit gesättigter alkoholischer Sublimatlösung. Die erhaltene Fällung saugt man ab, wäscht sie mit alkoholischer Sublimatlösung, zersetzt sie mit Schwefelwasserstoff und erhält die Chloride, die sich nunmehr meist ohne sonderliche Schwierigkeit in gut kristallisierende Aurate überführen lassen. Auf diese Weise gelang es, das

„Reduktonovain“ aus Menschenharn und das γ-Methylpyridin[1]) aus Pferdeharn zu erhalten.

Das Filtrat der Sublimatfällung kann man verdunsten, in Wasser lösen, durch Schwefelwasserstoff das Quecksilber beseitigen und die durch Sublimat nicht gefällten Chloride wieder ebenfalls in die Aurate überführen. Dieselben kristallisieren jetzt, nachdem durch Alkohol und Sublimat das Gemenge einigermaßen zerlegt worden ist, auch meist sehr schnell. So konnte ich an dieser Stelle das „Vitiatin“ aus dem Menschenharn darstellen.

Diese allgemeinere Methode gestattet allerdings eine ganze Anzahl bisher unbekannter Harnbasen darzustellen, aber wir sind mit unseren Untersuchungen doch erst im Beginn, das sieht man sofort, wenn man aus dem Filtrat der Platinfällung das Platin beseitigt und die Lösung der durch Platin nicht fällbaren Chloride einengt. Es hinterbleibt dann ein reichlicher Sirup, der noch seiner Aufteilung in kristallinische Körper harrt. Ich habe dahinzielende Untersuchungen in Gang gesetzt, doch läßt sich ihr Ende nicht absehen.

*Lohmann* und ich benutzten bei unseren Untersuchungen die Phosphorwolframsäure, ein Fällungsmittel, mit dem man nach unserer derzeitigen Kenntnis alle Basen niederschlagen kann. Nachdem wir uns mit Hilfe dieses ausgezeichneten Reagenzes überzeugt hatten, daß in der Tat im normalen Harn eigenartige Basen auftreten, ist derselbe von *Engeland*[2,3]) mit spezifischen Methoden untersucht worden. *Engeland* verfuhr bei seinen Arbeiten folgendermaßen.

I. Nach dem Vorgang von *Johnson* fällte er 24 *l* normalen menschlichen Harn mit gesättigter wässeriger Sublimat- und Natriumacetatlösung, bis ein weiterer Zusatz dieser beiden Reagenzien in einer Probe erst nach längerer Zeit einen Niederschlag erzeugte. Nach mehrtägigem Stehen saugte er den Niederschlag ab, wusch ihn mit einem Gemenge von Sublimat- und Natriumacetatlösung, digerierte ihn mit verdünnter Salzsäure auf dem Wasserbade, saugte den in Lösung gegangenen Teil ab, entfernte daraus durch Schwefelwasserstoff das Quecksilber und dampfte die Chloride auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Kristallisation ein. Hierauf nahm er den Rückstand mit Methylalkohol auf. Es blieben die anorganischen Salze zurück. Die methylalkoholische Lösung wurde bei mäßiger Wärme vom Methylalkohol befreit, der Rückstand mit kaltem Äthylalkohol digeriert. Der Äthylalkohol ließ das Kreatininchlorid, das im Methylalkohol leicht löslich ist, und Ammoniumchlorid zurück. Die äthylalkoholische Lösung wurde mit 20%iger alkoholischer Platinchloridlösung gefällt. Die Fällung bestand im wesentlichen noch aus Kreatininplatinat, das Filtrat da-

---

[1]) *Achelis* und *Kutscher*, Der Nachweis organischer Basen im Pferdeharn. Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. 52. S. 91. Jg. 1907.

[2]) *R. Engeland*, Über den Nachweis organischer Basen im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 57. S. 48. Jg. 1908.

[3]) *R. Engeland*, Die Diazoreaktion des normalen Harns. Münchener med. Wochenschrift. Jg. 1908. Nr. 31.

von aber lieferte eine neue Base. Es wurde aus ihm durch Schwefelwasserstoff das Platin beseitigt, die Chloride zum Sirup eingeengt und mit 30%iger wässeriger Goldchloridlösung versetzt. Nach längerem Stehen schied sich in großen, gelben Tafeln und festen Krusten das Aurat des asymmetrischen Dimethylguanidins ab. Die Mutterlauge davon gab nach Entfernung des Goldes starke Diazoreaktion, ist aber bisher nicht näher untersucht worden.

II. Etwas anders ging *Engeland* bei einer zweiten Untersuchung vor. 28 *l* Harn wurden auf $^1/_3$ eingeengt, dann nach dem Verfahren von *Kutscher*[1]) und *Steudel* mit Tannin gereinigt und die danach auf ca. 10 *l* gebrachte Flüssigkeit mit heißer gesättigter Natriumacetat- und Sublimatlösung ausgefällt. Die Behandlung des Niederschlages geschah wie in I, nur wurden die in Methylalkohol löslichen Chloride wiederholt mit Äthylalkohol aufgenommen, bis sie sich ganz glatt auch in kaltem Äthylalkohol lösten. Aus der Lösung wurde schließlich der Äthylalkohol verjagt und der Rückstand sofort mit 30%iger wässeriger Goldchloridlösung versetzt. Es schied sich reichlich Methylguanidinaurat ab. Davon wurden 2·1 *g* gewonnen. Über die in die Tanninfällung gegangenen Substanzen stehen nähere Mitteilungen noch aus.

III. Etwa 40 *l* menschlicher Harn wurden unmittelbar abwechselnd mit heißer gesättigter Sublimat- und Natriumacetatlösung so lange versetzt, bis eine filtrierte Probe der Flüssigkeit mit einem Überschuß der kalt gesättigten Fällungsmittel auch beim Stehen keine Trübung mehr gab. Die Fällung ist hier viel umfangreicher wie in I., wenigstens gab das Filtrat der Quecksilberfällung nach Beseitigung des Quecksilbers nicht mehr die *Weyl*sche Reaktion auf Kreatinin. Nach einigen Tagen saugte man die Fällung ab, wusch sie mit einem Gemenge von kalt gesättigter Sublimat- und Natriumacetatlösung aus. Man behandelte sie dann zunächst wie in I. Die aus ihr gewonnenen Chloride wurden mit Äthylalkohol aufgenommen, bis man eine auch in Äthylalkohol leicht lösliche Masse erhielt, die mit alkoholischer 20%iger Platinchloridlösung gefällt wurde. Die Platinfällung wurde in heißem Wasser gelöst, das schwer lösliche Ammoniumplatinat beseitigt, das Platin aus der Lösung als Platinsulfid abgeschieden und die zum Sirup eingeengten Chloride mit 30%iger Goldchloridlösung versetzt. Nach einigen Tagen kristallisierte zuerst eine Verbindung, die dem Vitiatin in ihren Analysenwerten nahekam, danach aber kam ein sehr leicht lösliches Goldsalz heraus, dem die Formel $C_{15}H_{36}N_8O_{13} . HCl . AuCl_3$ zukam. Das Chlorid dieses Körpers gab die Biuret-, die Diazo-, die *Knoop*sche Reaktion. Die *Millon*sche Reaktion fiel negativ aus.

Das Filtrat der Platinfällung wurde nach Vertreibung des Alkohols von Platin befreit, die Chloride zum Sirup eingeengt und mit 30%iger Goldchloridlösung versetzt. Nach einiger Zeit kristallisierte Methylguanidinaurat heraus.

[1]) *Kutscher*, Über *Liebigs* Fleischextrakt. Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. **10**. S. 528. Jg. 1905.

Die Mutterlauge des Methylguanidinaurates wurde mit Schwefelwasserstoff vom Gold befreit, die Chloride zum Sirup abgedunstet. Mit absolutem Alkohol aufgenommen, wurde in die alkoholische, heiße Lösung der Chloride feingepulvertes Kadmiumchlorid bis zur Sättigung eingetragen. Es bildete sich eine voluminöse Fällung (Kadmiumfällung I). Das Filtrat von Kadmiumfällung I gab auf Zugabe alkoholischer Natriumacetatlösung eine weitere reichliche Fällung (Kadmiumfällung II). Sie wurden vereinigt, in Wasser gelöst, mit Schwefelwasserstoff vom Kadmium befreit. Die erhaltenen Chloride wurden durch wiederholtes Abdampfen mit Alkohol möglichst von überschüssiger Salzsäure befreit, der Rest der Salzsäure wurde durch Silbernitrat beseitigt. Im Filtrat vom Chlorsilber wurde durch Silbernitrat und Ammoniak in der Weise, wie es vom Histidin bekannt ist, ein reichlicher Niederschlag hervorgerufen. Nachdem er abfiltriert und mit Salzsäure zersetzt war, ließ sich aus der salzsauren Lösung zunächst salzsaures Histidin darstellen, das sich in Histidinpikrolonat überführen ließ.

In etwas einfacherer Weise hat *Engeland*[1]) dann noch eine Substanz aus dem Harn darstellen können, die jedenfalls als Imidazolaminoessigsäure aufzufassen ist. Er reinigte 14 *l* Harn mit Bleizucker, entfernte den überschüssigen Bleizucker mit Natriumkarbonat, engte den Harn auf $^1/_3$ ein, säuerte mit Essigsäure an und fällte mit heißer gesättigter Sublimat- und Natriumacetatlösung. Die aus der Fällung nach I gewonnenen, in Äthylalkohol löslichen Chloride wurden durch Silbernitrat von Salzsäure befreit. Aus dem Filtrat vom Chlorsilber wurden die Diazoreaktion gebenden Basen durch Silbernitrat und überschüssigen Baryt abgeschieden, ähnlich dem Arginin. Die Fällung wurde nochmals in Salpetersäure gelöst, die Lösung mit feingepulvertem Baryt gesättigt, der entstandene Niederschlag abgesaugt, nochmals in Salpetersäure gelöst und die Flüssigkeit tropfenweise mit Ammoniak versetzt, solange sie mit ammoniakalischer Silberlösung eine Trübung gab. Die abgesaugte, gut gewaschene Fällung wurde mit Salzsäure zersetzt. Das Chlorid führte *Engeland* dann in das gut kristallisierende Pikrolonat über, indem er es nach der Vorschrift von *Steudel* mit alkoholischer Pikrolonsäure fällte.

Außer diesen beiden die Diazoreaktion gebenden Basen tauchen im Harn noch andere Basen mit der gleichen Eigenschaft auf. Ihnen allen ist die Fällbarkeit durch Phosphorwolframsäure und Silbernitrat und Baryt gemeinsam. Dagegen werden sie nicht alle durch Sublimat- und Natriumacetatlösung niedergeschlagen, auch wenn man diese Reagenzien heißgesättigt auf konzentrierte Harne einwirken läßt.

Methode zur Bestimmung des Trimethylamins im Harn nach *de Filippi*[2]):

---

[1]) *R. Engeland,* Über den Nachweis arganischer Basen im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **57**. S. 60. Jg. 1908.

[2]) *Filippo de Filippi,* Das Trimethylamin als normales Produkt des Stoffwechsels nebst einer Methode für dessen Bestimmung im Harn und Kot. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **49**. S. 433. Jg. 1906.

Seit den Untersuchungen von *Dessaignes*[1]) im Jahre 1856 wissen wir mit Sicherheit, daß man durch Destillation des menschlichen Harns mit fixem Alkali merkliche Mengen von Trimethylamin erhalten kann. *De Filippi* hat nun folgende Methode zur Darstellung von Trimethylamin aus Harn angegeben. Dieselbe wird durch die beigefügte Abbildung (siehe Seite 874) erläutert, die mit Erlaubnis des Verlages von Karl J. Trübner hier reproduziert ist.

Der ganze in 24 Stunden gesammelte Harn wird in einen Kolben von 2500—3000 *cm*³ gebracht, der 10—15 *g* KOH in Stücken und etwas festes Paraffin enthält. Er wird sofort mit dem Kühler in Verbindung gesetzt. Im Sammelgefäß *D* befinden sich 100—150 *cm*³ auf $^1/_3$ verdünnte Salzsäure vom spez. Gew. 1·19. Das *Peligot*sche Rohr *E* enthält Glasperlen, die mit verdünnter HCl angefeuchtet sind. Nun wird im Wasserdampfstrom destilliert, bis ungefähr 1 Liter Flüssigkeit sich in *D* gesammelt hat. Dann bringt man den Inhalt der Vorlage und des *Peligot*schen Rohres quantitativ in eine Schale und dampft darin bei mäßiger Temperatur zur Trockene ab. Der Rückstand wird gepulvert, mit absolutem Alkohol extrahiert, der Alkohol verdunstet, der so gewonnene Rückstand wieder mit absolutem Alkohol aufgenommen, die neue Lösung abgedampft und der verbleibende Rückstand nochmals mit Alkohol von 99·8% behandelt. Diese drei Extraktionen genügen, um das den Aminen beigemischte Chlorammonium bis auf Spuren zu entfernen.

Der nach der letzten Extraktion gewonnene Rückstand wird in wenigen Kubikzentimetern Wasser gelöst und die Lösung quantitativ in den Kolben *B* des abgebildeten Apparates übergeführt. Der Kolben wird dann sofort durch *C* mit dem Kühler verbunden. Das *Peligot*sche Rohr und das Sammelgefäß *D* enthalten 15—20 *cm*³ verdünnte Salzsäure. Aus dem Hahnentrichter läßt man nun 25 *cm*³ Hypobromitlösung (25 *cm*³ Brom in 500 *cm*³ einer 20%igen Lösung von KOH) in den Destillationskolben tropfen und schüttelt vorsichtig. Falls nach dem Aufschäumen die Flüssigkeit nicht ausgesprochen zitronengelbe Farbe annimmt, ist neue Hypobromitlösung zuzusetzen.

Um den Überschuß von Hypobromit zu beseitigen, gießt man durch den Trichter in den Kolben auf $^1/_3$ verdünnte Salzsäure vom spez. Gew. 1·19, und zwar soviel Kubikzentimeter, als Hypobromitlösung verwendet wurde. Durch das freigewordene Brom nimmt die Flüssigkeit eine kirschrote Färbung an.

Jetzt wird das Brom abdestilliert; nachdem dasselbe übergetrieben ist, unterbricht man die Erhitzung und ersetzt den Sammelkolben durch einen anderen ebenfalls 10—15 *cm*³ verdünnte HCl enthaltenden Kolben. Der Inhalt des ersten Kolbens wird sofort auf dem Wasserbade eingedampft.

Es bleibt noch die Destillation des Trimethylamins übrig. Zu dem Zweck macht man den Inhalt des Destillationskolbens mit einem Volum einer 30%igen Lösung von KOH, das dem Volum der vorher verwendeten

[1]) *Dessaignes*, Trimethylamin aus Menschenharn. *Liebigs* Annalen. Bd. **100**. S. 218. 1856.

Salzsäure entspricht, alkalisch. Die alkalische Flüssigkeit destilliert man. Durch Zutropfenlassen von Wasser aus dem Hahntrichter erhält man den Inhalt des Destillationskolbens auf annähernd gleichem Niveau. Man destilliert, bis das Destillat nicht mehr alkalisch reagiert; zu diesem Zeitpunkt finden sich zirka 300 $cm^3$ Destillat in der Vorlage. Man führt das zweite Destillat mitsamt dem Inhalt des *Peligot*schen Rohres quantitativ in dieselbe Schale über, die das erste Destillat enthielt, aus dem inzwischen das Brom ausgetrieben wurde. Auf dem Wasserbade wird nun der Schaleninhalt auf wenige Kubikzentimeter reduziert.

Während des Eindampfens füllt man in das *Peligot*sche Rohr und den Sammelkolben zusammen 25 $cm^3$ n/10-HCl und schließt beide wieder an den Apparat an. Das Residuum des eingedampften Destillates wird wieder in den Destillationskolben gefüllt, durch 50 $cm^3$ KOH von 10% alkalisch gemacht und dann das Trimethylamin in die titrierte Salzsäure überdestilliert. Zum Schluß wird der Inhalt des Sammelkolbens und des *Peligot*schen Rohres durch n/10-KOH titriert. Der ganze Prozeß nimmt 2½ Tage in Anspruch.

Ich lasse nunmehr eine Beschreibung derjenigen Harnbasen folgen, die genauer bekannt sind.

1. Methylguanidin, $C \begin{cases} NH_2 \\ = NH \\ NH.CH_3 \end{cases}$. Das Methylguanidin ist eine starke Base, die in freiem Zustand sich wenig zur Analyse eignet, auch das Chlorid ist stark hygroskopisch und zerfließlich. Es bildet aber eine ganze Anzahl gut kristallisierender Verbindungen, die seine Reindarstellung und Festlegung nicht schwierig machen.

*a)* Das Chloraurat, $C_2H_7N_3.HCl.AuCl_3$, kristallisiert in rhombischen, in Wasser, Alkohol und Äther schwer löslichen Kristallen. Dieselben schmelzen scharf bei 198°.

*b)* Das Chloroplatinat, $(C_2H_7N_3.HCl)_2.PtCl_4$, kristallisiert in monoklinen Prismen. Es ist in Wasser und Alkohol ziemlich leicht löslich.

*c)* Das Pikrat, $C_2H_7N_3.C_6H_2(NO_2)_3OH$, bildet in Wasser und Alkohol sehr schwer lösliche Nadeln. Es schmilzt bei 192°.

*d)* Das Pikrolonat, $C_2H_7N_3.C_{10}H_8N_4O_5$, kristallisiert in kleinen Drusen, die aus mikroskopischen Nadeln und Säulen bestehen. In 100 Teilen Wasser lösen sich 0·025 Teile Pikrolonat, leichter löslich ist es in absolutem Alkohol. Es schmilzt unter Aufschäumen bei zirka 270°, nachdem es sich vorher verfärbt hat.

*e)* Das Nitrat, $C_2H_7N_3.HNO_3$, kristallisiert in rechtwinkeligen rhombischen Tafeln. Es ist in Wasser und verdünnter Salpetersäure ziemlich schwer löslich. Schmelzpunkt 155° C.

2. Dimethylguanidin, $C \begin{cases} NH_2 \\ = NH \\ N(CH_3)_2 \end{cases}$. Nähere Angaben über die freie Base und das Chlorid liegen nicht vor. Am besten zu seiner Darstellung eignet sich wohl das Aurat und das Pikrolonat.

*a)* Das Chloraurat, $C_3H_9N_3 . HCl . AuCl_3$. Dasselbe scheidet sich bei langsamer Kristallisation in breiten Tafeln, bei schneller Kristallisation in dünnen, glänzenden Blättchen ab. Die Kristalle schmelzen bei 144° und zersetzen sich bei etwa 150°. Nach *Haushofer* (Jahresberichte über die Fortschritte der Chemie, 1882, S. 364) sollen die Kristalle trimetrisch sein.

*b)* Das Pikrolonat, $C_3H_9N_3 . C_{10}H_8N_4O_5$, ist dem Pikrolonat des Methylguanidins ganz ähnlich beschaffen. Auch im Schmelzröhrchen verhält es sich ganz ähnlich.

*c)* Das Chloroplatinat, $(C_3H_9N_3 . HCl)_2 . PtCl_4$, ist in Wasser und Alkohol leicht löslich.

3. Methylpyridylammoniumhydroxyd,

```
          CH
    CH /    \\ CH
      ||     |
    CH ||    | CH
        \\  //
          N
         / \
      CH3   OH
```

Die ersten Nachrichten über das Auftreten dieser merkwürdigen Base im Harn stammen von *His.*[1]) Derselbe erhielt sie nach Verfütterung von Pyridin an Hunde. Der Körper zerstörte das verfütterte Pyridin nicht, sondern führte es unter Anlagerung einer $CH_3$-Gruppe in die weniger giftige Ammoniumbase über. Da wir wissen, daß im Tabakrauch und im Kaffee sich Pyridin findet, so muß diese Base den Organismus des Menschen, der die beiden Genußmittel in beträchtlichen Mengen gebraucht, gleichfalls als Methylpyridylammoniumhydroxyd passieren und in dieser Form sich im normalen Harn finden. Ein großer Teil des Methylpyridylammoniumhydroxyds, das man im menschlichen Harn findet, braucht allerdings nicht erst aus dem Pyridin hervorzugehen. Es hat sich nämlich bei genauen Untersuchungen des Kaffeeextraktes gezeigt, daß darin schon Methylpyridylammoniumhydroxyd präformiert enthalten ist und nach seiner Aufnahme unverändert durch den Körper hindurch geht. Nun ist weiter im Kaffee, wie wir aus der im Jahre 1902 in Erlangen erschienenen Inauguraldissertation von *Görte* wissen, eine Base, die dem Methylpyridylammoniumhydroxyd sehr nahe steht, nämlich das Trigonellin, enthalten. Nach Untersuchungen von *Kohlrausch*[2]) beteiligt sich dieser Körper aber wahrscheinlich nicht an der Bildung des Methylpyridylammoniumhydroxyds im Harn, sondern er verläßt entweder den Körper unverändert oder wird in anderer Weise abgebaut. Das Methylpyridylammoniumhydroxyd ist nach den vorliegenden Untersuchungen die-

[1]) *W. His,* Über das Stoffwechselprodukt des Pyridins. Archiv f. exper. Pathol. u. Therap. Bd. 22. S. 253. Jg. 1887; siehe auch *R. Cohn,* Über das Verhalten einiger Pyridin- und Naphthalinderivate im tierischen Stoffwechsel. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 18. S. 116. Jg. 1894.

[2]) *A. Kohlrausch,* l. c.

jenige Base, über deren Entstehung und Erscheinen im Harn wir die genauesten Angaben machen können.

*a)* Die Lösung der freien Base reagiert stark alkalisch und verändert sich auch beim Kochen nicht. Dampft man aber sehr stark ein, dann zersetzt sie sich teilweise unter Bildung roter Schmieren. Viel leichter erfolgt die Zerstörung der freien Base bei Gegenwart von fixem Alkali.

*b)* Das Chlorid kristallisiert in kräftigen, weißen, hygroskopischen Nadeln. Dieselben sind in Wasser und Alkohol leicht löslich.

*c)* Das Chloraurat, $C_5H_5N.CH_3Cl.AuCl_3$, bildet kräftige Nadeln, die in kaltem Wasser sehr schwer löslich sind. Aber auch in heißem Wasser löst es sich nicht leicht. Es schmilzt bei 252—253° zu einer klaren rotbraunen Flüssigkeit. Wegen seiner sehr geringen Löslichkeit hat sich dieses Salz bei der Darstellung der Base aus Harn besonders bewährt.

*d)* Das Chloroplatinat, $(C_5H_5N.CH_3Cl)_2.PtCl_4$, kristallisiert bei langsamer Kristallisation in schönen orangeroten Tafeln, bei schneller Kristallisation fällt es in glänzenden, lachsfarbenen Blättern aus. Es schmilzt bei 205 bis 207°. Auch dieses Salz ist in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich, doch lange nicht in dem Maße wie das Aurat, in heißem Wasser ist es leicht löslich. Unlöslich hingegen ist es in Alkohol.

*e)* Sehr gut geeignet zur Isolierung der Base sind auch ihre Quecksilberverbindungen. Dieselben kristallisieren gut, sind in Wasser schwer, in Alkohol kaum löslich und kristallisieren gut. Die Hg-Verbindungen sind bisher nicht analysiert worden. Sie scheinen trotz ihrer guten Eigenschaften ganz unbekannt geblieben zu sein.

4. γ-Methylpyridin:

```
        C.CH3
   CH /   \\ CH
     ||    |
   CH \   // CH
         N
```

Die freie Base siedet bei 142·5—144·5°.

*a)* Das Chloraurat, $C_6H_7N.HCl.AuCl_3$, kristallisiert in Prismen, es schmilzt bei 201—203°. In Wasser ist es schwer löslich.

*b)* Das Chloroplatinat, $(C_6H_7N.HCl)_2.PtCl_4$, kristallisiert in Blättchen und Tafeln. Es ist in kaltem Wasser schwer löslich. Es schmilzt gegen 240° unter Aufschäumen. Die Base ist von *Achelis* und mir im Pferdeharn gefunden.

5. Novain, $C_7H_{19}NO_3$.

Die Base ist von *Lohmann* und mir zweimal aus dem Harn von Hunden gewonnen worden, die mit Fleischextrakt gefüttert waren, das von einer englischen Gesellschaft unter dem Namen „Extractum carnis Liebig" in den Handel gebracht wird. Wir isolierten die Substanz in Form des Goldsalzes aus dem Filtrat des zunächst mit Silbernitrat und Baryt ausgefällten Harns. Die gleiche Base ist bereits vorher von *Stéphane Da-*

*browski*[1]) auch aus 100 *l* Menschenharn dargestellt worden, und zwar in Form ihres leicht löslichen Platinates. Der Körper ist deshalb von Wichtigkeit, weil, wie ich[2]) zeigen konnte, sich aus ihm bei Destillation mit festem Baryt Trimethylamin abspalten läßt. Wir haben in ihm also jedenfalls eine Quelle des Trimethylamins, das sich von *Dessaignes* aus dem Harn abdestillieren ließ. Das Aurat kristallisierte in rotgelben Säulen, die bei 135° schmelzen.

6. Reduktonovain, $C_7H_{17}NO_2$.

Die Substanz wurde von mir aus Frauenharn gewonnen. Es ist von ihm bisher nur das gut kristallisierende Chlorid und Aurat dargestellt worden. Das Chlorid kristallisiert in langen, glänzenden, in Wasser und Alkohol leicht löslichen Nadeln.

Das Chloraurat, $C_7H_{16}NOCl.AuCl_3$, ist näher untersucht worden. Es scheidet sich zunächst als Öl aus seiner Lösung ab, das sich langsam in kleine Drusen von Blättchen und kurzen Nadeln umwandelt. Gegen Licht ist es empfindlich. Bei 80° beginnt es schon etwas zu sintern, bei 125° kann man stärkeres Sintern beobachten, zwischen 155—160° schmilzt die Substanz, wird aber erst zwischen 175—180° ganz klar. Über 180° erhitzt beginnt sie Blasen zu werfen.

Das aus dem analysenreinen Chloraurat dargestellte Chlorid wurde von festem Baryt destilliert. Es spaltete ebenfalls Trimethylamin ab. Durch diese Beobachtungen ist die Frage nach dem im Harn nachgewiesenen Trimethylamin eine recht komplizierte geworden. Zweifellos ist ein großer Teil des von *Filippi*[3]) und *Dessaignes*[4]) aus Harn hergestellten Trimethylamins Kunstprodukt, das aus höher zusammengesetzten Verbindungen, wie ich sie eben beschrieben habe, stammt.

Neuerdings hat auf meine Veranlassung Herr *Takeda* menschlichen Harn nicht wie *Filippi* mit starker Kalilauge, sondern mit Magnesiumoxyd destilliert und dabei auch geringe Mengen einer Verbindung erhalten, die wahrscheinlich Trimethylamin ist. Um jedoch endgültige Aufklärung über das im Harn präformierte Trimethylamin zu erhalten, wird man wohl die Destillation mit Magnesiumoxyd im Vakuum vornehmen müssen. Diese Versuche stehen noch aus, sollen aber ebenfalls durch Herrn *Takeda* durchgeführt werden.

7. Vitiatin, $C_5H_{14}N_6$.

Diese Base ist öfter im Harn gefunden, doch bisher nur als Goldsalz bekannt.

[1]) *Stéphane Dabrowski*, Sur la mannite et les ptomaïnes dans l'urine normale de l'homme. Sonderabzug aus den Archives polonaises des sciences biologiques et médicales. Jg. 1903.

[2]) *Kutscher*, Zur Kenntnis des Novains. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **49**. S. 47. Jg. 1906.

[3]) *Filippo de Filippi*, l. c.

[4]) *Dessaignes*, l. c.

Das Chloraurat, $C_5H_{14}N_3 . 2HCl . 2AuCl_3$. Es ist in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich und kristallisiert aus salzsaurem Wasser in gelbroten glänzenden Blättern und Platten, die unscharf bei 167° schmelzen, aber erst bei 190° eine klare Schmelze liefern.

8. Gynesin, $C_{19}H_{23}N_3O_3$.

Das Gynesin ist nur in seinem Goldsalz bekannt.

Das Chloraurat, $C_{19}H_{23}N_3O_3 . 2HCl . 2AuCl_3$, kristallisiert bei langsamer Kristallisation in kräftigen, vierseitigen, rotgelben Säulen, bei schneller Kristallisation in dünnen, hellgelben Nädelchen. Dieselben schmelzen bei 180° zu einer trüben Masse zusammen, die erst zwischen 205—210° in eine klare, dunkelrote Flüssigkeit übergeht. Es ist in kalter verdünnter Salzsäure schwer, in heißer leicht löslich.

9. Mingin, $C_{13}H_{18}N_2O_2$.

Der genannte Körper wurde nur in sehr geringer Menge zunächst als Chlorid dargestellt, das in kaltem Alkohol ziemlich schwer löslich war.

Das Chloraurat, $C_{13}H_{18}N_2O_2 . 2HCl . 2AuCl_3$, kristallisierte in kleinen durchsichtigen, gelbroten, vierseitigen Säulen. Es schmolz scharf bei 194° und war in verdünnter, kalter Salzsäure nicht ganz leicht löslich.

10. Imidazolammonoessigsäure, $C_5H_7N_3O_2$.

Die Verbindung wurde schließlich als Pikrolonat gewonnen.

Pikrolonat, $C_5H_7N_3O_2 . C_{10}H_8N_4O_5$, kristallisiert in kurzen, in Alkohol und Wasser schwer löslichen Nadeln, die sich bei 244° zersetzen. Die freie Base gibt starke Diazoreaktion.

11. Histidin, bezüglich des Histidins vgl. die einschlägigen Artikel in diesem Handbuch.

12. Kynosin, $C_{13}H_{26}N_4O_4$. Aus normalem Hundeharn erhielten *Lohmann* und ich ein Goldsalz, für das sich die Formel $C_{13}H_{26}N_4O_4 . 2HCl . 2AuCl_3$ berechnen ließ. Die Ausbeute war gering und es ließ sich daher nur die Formel festlegen. Das Goldsalz war in kalter verdünnter HCl ziemlich schwer löslich. Weitere Angaben über die Eigenschaften dieser Verbindung können wir nicht machen.

# C. Nachweis, Bestimmung und Isolierung der Abbauprodukte des Nukleinstoffwechsels im Harn und in den Fäzes (Purinbasen, Methylpurine, Harnsäure, Allantoin). Anhang: Untersuchung der Harnsteine.

Von **Alfred Schittenhelm**, Erlangen.

## A. Purinbasen, Methylpurine, Harnsäure.

Für die Isolierung der Purinbasen, der Methylpurine (mit Ausnahme von Koffein und Theobromin, welche deshalb gesondert behandelt werden) und der Harnsäure haben sich zwei Methoden besonders bewährt. Die eine ältere beruht auf ihrer Fällbarkeit durch Silbernitrat bei Gegenwart von Ammoniak; die andere neuere ist auf Grund einer Beobachtung von *Drechsel* [1]) durch *Krüger* [2]) ausgearbeitet worden und basiert darauf, daß mit Hilfe von Kupfersulfat und Bisulfit alle Purinkörper, welche noch eine substituierbare NH-Gruppe enthalten, namentlich aus heißen Lösungen, als Kupferoxydulverbindungen gefällt werden. Die beiden Fällungsmethoden, die Silber- und die Kupferfällung, sind sich gleichwertig, solange es sich um vollkommen eiweißfreie Lösungen handelt. Eiweißhaltige Lösungen sind stets vor der Fällung mit Essigsäure und Kochsalz zu enteiweißen. Bekanntlich gelingt aber oft genug die Enteiweißung keineswegs vollständig; es bleiben vor allem Peptone, aber auch geringe Eiweißmengen in Lösung. Unter diesen Umständen aber wird die Fällung der Purinkörper als Silberverbindungen derartig beeinflußt, daß die mit der Silbermethode erhaltenen Bestimmungen nicht mehr quantitativ sind; man erhält oft viel zu geringe Werte. Andrerseits aber hindern diese Umstände die Fällung der Purinkörper als Kupferoxydulverbindungen in keiner Weise, wohl aber wird ein Teil dieser Eiweißkörper dem Kupferniederschlag beigemengt. Durch eine Wiederholung der Fällung kann jedoch diesem Übelstande leicht abgeholfen werden. [3]) Daher ist die Kupferfällung der Silberfällung entschieden überlegen.

[1]) *E. Drechsel,* Über eine neue Reaktion gewisser Xanthinkörper. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Bd. **25**. S. 2454.

[2]) *M. Krüger,* Über die Fällbarkeit der Harnsäure und der Basen der Harnsäuregruppe als Kupferoxydulverbindungen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **18**. S. 351 (1894).

[3]) *M. Krüger* und *A. Schittenhelm*, Die Menge und Herkunft der Purinkörper in den Fäzes. II. Mitt. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **45**. S. 14 (1905).

Es muß übrigens erwähnt werden, daß die Gegenwart der Nukleinsäure beide Fällungen verhindert oder ungenau macht. Eine solche Lösung muß unbedingt vor Anwendung der Fällung durch Kochen mit verdünnter Mineralsäure aufgeschlossen werden (siehe darüber S. 887), wenn es nicht gelingt, die Nukleinsäure auf anderem Wege quantitativ zu entfernen.

Es mag hier erwähnt sein, daß ein namentlich in England und Amerika viel geübtes Verfahren zur Bestimmung der Harnsäure im Urin, beruhend auf ihrer Fällbarkeit als harnsaures Ammoniak durch Sättigung des Urins mit Salmiak angegeben ist. Dasselbe ist mehrfach modifiziert. Es ist jedoch vollkommen entbehrlich, da es an Einfachheit der Ausführung keine Vorteile hat und sicherlich, mindestens für den Nachweis kleiner Mengen, weniger exakt ist. Wir wollen aber doch der Vollständigkeit halber auf ihre Anführung an dieser Stelle nicht verzichten.

## A. Bestimmung der Harnsäure und Purinbasen im Urin.

### Quantitative Methoden:

Kupfersulfat-Bisulfitmethode nach *Krüger* und *Schmid*.[1]

Prinzip. Die Purinkörper werden als Kupferoxydulverbindungen gefällt und diese durch Schwefelnatrium zerlegt. Aus der wässerigen Lösung wird beim Eindampfen mit HCl die Harnsäure ausgefällt. Aus dem Filtrat der Harnsäure gewinnt man die Purinbasen als Kupferoxydul- oder Silberverbindungen. Der Stickstoffgehalt der Harnsäure und Purinbasen wird nach *Kjeldahl* bestimmt.

Lösungen. 1. Käufliche ca. 40%ige Natriumbisulfitlösung (*Kahlbaum*); 2. 10%ige Kupfersulfatlösung; 3. Natriumsulfidlösung: von einer 1%igen reinen Natronlauge (1000 *cm*³) sättigt man die Hälfte mit Schwefelwasserstoff und vereinigt sie dann mit der anderen; 4. Aufschwemmung von *Braunstein*: Eine heiße, 0·5%ige Lösung von Kaliumpermanganat wird mit Alkohol bis zur Entfärbung versetzt. Vor jedesmaligem Gebrauch umschütteln! 5. 10%ige Salzsäure; 6. 10%ige Essigsäure; 7. Natriumacetat in Substanz.

Ausführung. 400 *cm*³ eiweißfreien (eventuell vorher mit etwas Kochsalz und Essigsäure enteiweißten) Harns (der 4. oder 5. Teil der mit Wasser auf 1600 oder 2000 *cm*³ gebrachten Tagesmenge, wobei jedoch vorher ein etwa vorhandenes Sediment von Uraten oder Harnsäure quantitativ mittelst Lauge in Lösung gebracht worden ist) werden in einem Literrundkolben mit 24 *g* Natriumacetat und 40 *cm*³ Natriumbisulfitlösung versetzt, zum Kochen erhitzt und nach Zusatz von 40—80 *cm*³ Kupfersulfatlösung, je nachdem der Urin viel oder wenig Purinkörper enthält, mindestens 3 Minuten im Sieden erhalten. Der so gewonnene flockige Niederschlag der Kupferoxydulverbindungen wird sofort oder nach dem Abkühlen der

[1] *M. Krüger* und *J. Schmid*, Die Bestimmung der Harnsäure und Purinbasen im menschlichen Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 45. S. 1 (1905).

Flüssigkeit durch ein Faltenfilter filtriert, mit heißem Wasser solange gewaschen, bis das Filtrat farblos ist, und dann mit heißem Wasser vom Filter in den Kolben, in welchem die Fällung vorgenommen war, zurückgespritzt. Man gibt soviel $H_2O$ zu, daß die Flüssigkeit ca. 200 *cm*³ beträgt, erhitzt zum Sieden und zersetzt den Niederschlag durch Hinzugabe von 30 *cm*³ Natriumsulfidlösung. Man muß sich von der Vollständigkeit der Fällung überzeugen, indem man einen Tropfen der Flüssigkeit auf ein mit etwas Bleiacetat befeuchtetes Stück Filtrierpapier bringt; Braunfärbung zeigt den verlangten Überschuß von Natriumsulfid an; tritt sie nicht ein, so muß noch mehr zugegeben werden. Man vermeide aber ein zu starkes und ein zu lange dauerndes Erwärmen mit dem Schwefelalkali, weil sonst eventuell Harnsäure durch das Alkali zerstört wird. Ist die Zersetzung vollständig [1]), so säuert man mit Essigsäure an, erhält solange im Sieden, bis der ausgeschiedene Schwefel sich zusammenballt, filtriert heiß mit Hilfe der Saugvorrichtung oder eines Faltenfilters, wäscht mit heißem $H_2O$ mehrmals nach, fügt 10 *cm*³ 10%iger Salzlösung zu und dampft in einer Porzellanschale bis auf ca. 10 *cm*³ ein. Die Harnsäure scheidet sich dabei kristallinisch ab, die Purinbasen bleiben als salzsaure Verbindungen in Lösung. Zur vollkommenen Ausfällung der Harnsäure läßt man noch 2—3 Stunden stehen.

Die abgeschiedene Harnsäure wird auf einem kleinen Faltenfilter gesammelt, mit schwefelsäurehaltigem $H_2O$ kalt nachgewaschen, bis Filtrat und Waschwasser zusammen ca. 75 *cm*³ betragen und die Harnsäure samt dem Filter verascht. Zu der aus dem (durch Multiplikation mit 1·4) gefundenen Stickstoffwert (Harnsäurestickstoff) durch Multiplikation mit 3 berechneten Harnsäure sind noch 3·5 *mg* (für die in 75 *cm*³ Filtrat gelöste Harnsäure) hinzuzurechnen.

Im Filtrat werden die Purinbasen bestimmt:

*a)* Durch Kupferfällung. Das Filtrat samt Waschwasser wird mit Natronlauge alkalisch, mit Essigsäure wieder sauer gemacht; nach Erwärmen auf 70—80° wird ½—1 *cm*³ 10%ige Essigsäure und 10 *cm*³ Braunsteinlösung (um die im Filtrat noch vorhandene Harnsäure zu oxydieren) zugesetzt und eine Minute umgerührt oder geschüttelt. Jetzt gibt man 10 *cm*³ Natriumbisulfitlösung hinzu, welche den überschüssigen Braunstein in Lösung bringt, dann 5—10 *cm*³ der 10%igen Kupfersulfatlösung, erhält die Flüssigkeit 3 Minuten im Sieden, sammelt den Niederschlag durch Filtrieren auf einem Faltenfilterchen, wäscht mit heißem $H_2O$ und verascht den Niederschlag samt Filter nach *Kjeldahl*. Man erfährt so den Stickstoffgehalt der Purinbasen und rechnet auf die Tagesmenge um.

*b)* Durch Silberfällung. Lösungen: 1. Ammoniakalische Silberlösung. Man löst 26 *g* Silbernitrat in überschüssigem Ammoniak und füllt die Lösung mit destilliertem Wasser auf 1 *l* auf. 2. Magnesiamischung. Man löst 100 *g* kristallisiertes Magnesiumchlorid und 200 *g* Ammoniumchlorid

[1]) Man kann die Zersetzung nach meiner Erfahrung ebensowohl durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in die siedend heiße Lösung vornehmen.

in Wasser, fügt $NH_3$ bis zum starken Geruch und dann solange Wasser hinzu, bis das Ganze 1 *l* beträgt. 3. 6%ige Dinatriumphosphatlösung.

Man verfährt zunächst wie bei *a*. Die essigsaure Lösung, die den überschüssigen Braunstein enthält, wird ammoniakalisch gemacht; zur erkalteten Lösung werden 10 $cm^3$ der ammoniakalischen Silberlösung und Ammoniak bis zur völligen Lösung des ausfallenden Chlorsilbers zugegeben, hierauf 10 $cm^3$ Dinatriumphosphatlösung und 5 $cm^3$ der Magnesiamischung hinzugesetzt. Nach zweistündigem Stehen sammelt man den Niederschlag auf einem Faltenfilter, wäscht ihn mit destilliertem Wasser möglichst frei von Ammoniak, spritzt ihn mit heißem Wasser in einen Rundkolben von Jenaer Glas und vertreibt den Rest von $NH_3$ durch Kochen unter Zugabe von Magnesia usta. Jetzt wird das Ganze nach *Kjeldahl* verascht und man erfährt so die Menge des Purinstickstoffes.

Es sei noch auf einige Punkte hingewiesen, welche bei der Bestimmung Berücksichtigung verdienen. Es hat sich mir im Tierversuche als notwendig erwiesen, den meist etwas trüben, schlecht filtrierenden Urin, namentlich des Kaninchens, des Schweines etc., vor Anstellung der Bestimmung mit Schwefelsäure versetzt zu kochen. Man füllt den erhaltenen Urin auf ein bestimmtes Quantum (500—1000 $cm^3$) auf, nimmt davon 200—400 $cm^3$ und versetzt ihn mit soviel Schwefelsäure, daß das Gemisch 3- bis 5%ig ist. Nun wird am Rückflußkühler 2—3 Stunden gekocht, sodann mit Natronlauge alkalisch, mit Essigsäure wieder sauer gemacht, nochmals zum Sieden erhitzt und nun filtriert, wobei der Filter mehrmals tüchtig mit heißem Wasser gewaschen wird. In dem so erhaltenen, durch Waschwasser verdünnten Filtrat wird die Bestimmung wie beschrieben ausgeführt.

Enthält der Urin, wie der der Säugetiere, wenig Purinkörper, so wird weniger Kupfersulfatlösung zugegeben (20—30 $cm^3$). Es passiert dabei meist, daß beim Kochen neben dem geringen flockigen Niederschlag der Kupferoxydul-Purinkörperverbindungen auch freies Kupferoxydul feinkörnig ausfällt; dasselbe geschieht im menschlichen Urin, wenn erheblich zu viel Kupfersulfat zugegeben wird. Es schadet das absolut nichts; nur setzt sich das Kupferoxydul derart in das Filter, daß es nicht quantitativ abgespritzt werden kann. Da aber die flockigen Kupferoxydulniederschläge der Purinkörper sich sehr leicht abspritzen lassen, so kann man entweder das im Filter festsitzende freie Kupferoxydul vernachlässigen oder man wirft das ganze Filter in das heiße Wasser, zerkleinert es durch Zerteilen mit dem Glasstab und Schütteln möglichst ausgiebig und zersetzt nunmehr mit Natriumsulfid. Selbstverständlich muß dann unbedingt mit Hilfe der Saugpumpe abfiltriert werden unter gründlichem Waschen des Rückstandes.

Wird die Kupfersulfat-Bisulfitmethode zur Bestimmung oder Isolierung von Purinkörpern in Organen etc. benutzt, so geschieht die Fällung natürlich in der möglichst enteiweißten Lösung. Man gibt dann einen Überschuß von Bisulfit und Kupfersulfat zu. Im Filtrat der Purinkörper-Kupferoxydulverbindungen prüft man dann vorsichtshalber durch weitere Zugabe von Bisulfit und Kupfersulfat, ob die Fällung eine vollständige war und wiederholt das Verfahren, wenn nötig, wie angegeben. Richtig angewandt, ist die Bestimmung eine absolut einwandsfreie und quantitative.

Bei Zugabe des Natriumsulfids vermeide man womöglich einen größeren Überschuß. Es hält manchmal schwer, die nunmehr angesäuerte Lösung klar zu erhalten. Es gelingt jedoch bei einiger Übung trotzdem, ein klares Filtrat zu bekommen. Man muß nur zum Zusammenballen des Schwefels tüchtig (eventuell unter Zugabe von 10 $cm^3$ verdünnter HCl) kochen und die Lösung dabei von Zeit zu Zeit kräftig schütteln. Sollte trotzdem das Filtrat einmal grünschwarz getrübt sein, so dampft man es ein, nimmt den Rückstand mit ca. 200 $H_2O$ und etwas Natronlauge auf, erhitzt zum Sieden, macht essigsauer, filtriert und wiederholt im Filtrat die Fällung. Jetzt geht alles sicher glatt und bei genauem Arbeiten hat man keinerlei Verluste erlitten.

Wenn das salzsaure, die Harnsäure und Purinbasen enthaltende Filtrat, wie z. B. beim Kaninchen nach intravenöser Injektion von Nukleinsäure, mehr Basen enthält wie Harnsäure, so kann es leicht vorkommen, daß die Trennung der Harnsäure von den Basen schlecht gelingt. Es ist besonders das Xanthin, welches, sobald es in erheblicherer Menge vorhanden ist, infolge seiner schlechten Löslichkeit in verdünnter Salzsäure der Harnsäure beigemengt bleibt und irrtümlicherweise mitbestimmt wird. Man tut dann gut, zur Trockene einzudampfen und den Rückstand nach Direktiven von *Horbaczewski*[1]) in 2—3 $cm^3$ konzentrierter Schwefelsäure, eventuell unter gelindem Erwärmen zu lösen und die Lösung mit der vierfachen Menge Wasser zu versetzen. Nach fleißigem Rühren, bis sich die Harnsäure abzuscheiden beginnt, wird die Flüssigkeit 3—6 Stunden stehen gelassen und nun wie oben weiter verfahren.

### Silberfällung der Harnsäure nach *Ludwig-Salkowski.*[2])

Man beachte bei Verwendung dieser Methode die einleitenden Bemerkungen. Bei dieser Fällung wird die Harnsäure als Silberverbindung isoliert.

Lösungen. Dieselben wie S. 886 unter *b*.

Ausführung. Man mischt je 10 $cm^3$ der ammoniakalischen Silberlösung und der Magnesiamischung und gibt soviel Ammoniak zu, daß der entstandene Niederschlag von Chlorsilber wieder gelöst wird. Diese Lösung gibt man unter Umrühren zu 100 $cm^3$ Harn, wobei sofort ein Niederschlag entsteht, welcher die Purinkörper (Harnsäure und Basen) als Silbermagnesiaverbindungen enthält. Nach einstündigem Stehen wird filtriert (am besten mit Hilfe der Saugpumpe; doch ist sie nicht unbedingt notwendig). Der Niederschlag wird mit Wasser, dem einige Tropfen Ammoniak zugesetzt sind, mehrmals gründlich ausgewaschen und dann in ein Becherglas quantitativ übergespült. Man zerlegt nun den Niederschlag der Silbermagnesiaverbindungen mit Natriumsulfid genau wie bei der Kupfersulfat-Bisulfitmethode den Niederschlag der Kupferoxydulverbindungen und verfährt auch weiter, wie dort angegeben. Statt zum Schluß den Stickstoffgehalt der Harnsäure nach *Kjeldahl* zu ermitteln, kann man auch die ausgefallene Harnsäure auf einem gewogenen Filterchen sammeln, mit Wasser, Alkohol, Äther, Schwefelkohlenstoff und wiederum Äther auswaschen, bei 100—110° trocknen und wägen. Für je 10 $cm^3$ des wässerigen Filtrates muß man der gefundenen Harnsäure 0·00048 $g$ zuzählen.

Die Bestimmung der Purinbasen kann man im Filtrat, wie bereits unter der Kupfersulfat-Bisulfitmethode angegeben, ausführen.

Nach *Camerer*[3]) und *Arnstein*[4]) verfährt man zu diesem Zweck so, daß man zu 200 $cm^3$ eiweißfreien Urins, bei dessen Mischung auf etwa vorhandenes harnsäurehaltiges

[1]) *J. Horbaczewski*, Über die Trennung der Harnsäure von den Xanthinbasen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **18**. S. 341 (1894).

[2]) *Salkowski*, Über die Bestimmung der Harnsäure und Xanthinkörper im Harn. Zentralbl. f. d. med. Wissensch. Bd. **32**. S. 514 (1894); siehe auch *Virchows* Arch. Bd. **50**. S. 193 (1870) und Bd. **52**. S. 60. — *Maly*, Zur Bestimmung der Harnsäure. *Pflügers* Arch. Bd. **6**. S. 201 (1872). — *Ludwig*, Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Harnsäure. Wiener med. Jahrb. S. 597 (1884).

[3]) *W. Camerer*, Die quantitative Bestimmung der Harnsäure im menschlichen Urin. Zeitschr. f. Biolog. Bd. **26**. S. 89 (1889).

[4]) *R. Arnstein*, Über die Bestimmung der Xanthinbasen im Urin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **23**. S. 417 (1897).

Sediment, das vorher mit Lauge quantitativ in Lösung zu bringen wäre, zu achten ist, in einem Meßzylinder 30 $cm^3$ Magnesiamixtur setzt und nun mit 20%igem Ammoniak auf 300 $cm^3$ auffüllt. Man schüttelt die Mischung und filtriert sofort durch ein Faltenfilter. Vom Filtrat werden 125 $cm^3$ (die 100 $cm^3$ Harn entsprechen) abgemessen und 10 $cm^3$ ammoniakalischer Silberlösung unter Mischung zugeführt. Der Silberniederschlag wird sofort auf aschefreiem Papier abgesaugt und das Becherglas mit ammoniakalischem Wasser nachgewaschen. Nun saugt man so lange, bis der Niederschlag rissig wird und wäscht ihn dann mit Wasser aus, bis die Waschflüssigkeit nicht mehr alkalisch reagiert. Den Niederschlag kocht man dann in einem Kjeldahlkolben mit Wasser und etwas Magnesia usta ammoniakfrei und bestimmt dann seinen Stickstoffgehalt nach *Kjeldahl*. Man erfährt so den Stickstoff der gesamten Purinkorper (Harnsäure + Purinbasen). In einer anderen Harnsäureportion ist der Harnsäurestickstoff nach *Ludwig-Salkowski* bestimmt worden. Die Differenz beider Werte ergibt den Stickstoffgehalt der Purinbasen.

## Ammonfällung der Harnsäure nach *Hopkins*.[1])

Prinzip: Sättigung des Urins mit Salmiaksalz fällt nach *Hopkins* die Harnsäure quantitativ als Ammonurat.

Ausführung: *Hopkins* sättigt eine bestimmte Portion Urin mit Salmiak, filtriert das abgeschiedene Ammonurat ab, wäscht mit gesättigter Salmiaklösung aus, führt das Ammonurat durch Erhitzen mit Wasser und Salzsäure in freie Harnsäure über und bestimmt diese entweder durch Wägung oder durch Titration mit Schwefelsäure und $\frac{n}{20}$-Kaliumpermanganatlösung (1·582 *g* Kaliumpermangant in 1 *l* Wasser). 1 $cm^3$ Permanganatlösung entspricht 3·75 *mg* Harnsäure.

*Folin*sche Modifikation.[2]) 300 $cm^3$ Urin werden im Meßzylinder mit 75 $cm^3$ Ammonsulfatreagens (500 *g* Ammonsulfat, 5 *g* Uranacetat und 60 $cm^3$ 10%iger Essigsäure mit Wasser zu einem Liter gelöst) vermengt und ungefähr 5 Minuten absitzen gelassen. Dann wird durch ein Faltenfilter filtriert. 125 $cm^3$ vom Filtrat (= 100 $cm^3$ Urin; Doppelbestimmungen!) werden unter Umrühren mit 5 $cm^3$ konzentrierter Ammoniaklösung versetzt und bleiben bis zum nächsten Tag stehen. Das ausfallende Ammonurat setzt sich gut am Boden des Becherglases ab. Die überstehende Flüssigkeit wird durch ein kleines, glattes, dichtes Filter gegossen, der Niederschlag mit einer 10%igen Ammonsulfatlösung quantitativ darauf gebracht und mit derselben Lösung mehrmals gewaschen. Mit ca. 100 $cm^3$ Wasser wird der Niederschlag in ein Becherglas gespritzt, 15 $cm^3$ konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt und die noch heiße Lösung nunmehr mit $\frac{n}{20}$-Kaliumpermanganatlösung titriert. Am Schluß der Titration setzt man immer nur 2 Tropfen Permanganatlösung auf einmal zu, bis die erste schwache Rosafärbung durch die ganze Flüssigkeit mehrere Sekunden lang bestehen bleibt. 1 $cm^3$ der verbrauchten Permanganatlösung entspricht 3·75 *mg* Harnsäure.

---

[1]) *G. Hopkins*, Bestimmung der Harnsäure im Harn. Proc. of the Royal Soc. Vol. **52**. p. 93 (1892); Chem. Zentralbl. 1892. S. 269.

[2]) *O. Folin*, Eine Vereinfachung der *Hopkins*schen Methode zur Bestimmung der Harnsäure im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **24**. S. 224 (1898). — *O. Folin* und *Ph. A. Schaffer*, Über die quantitative Bestimmung der Harnsäure im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **32**. S. 552 (1900).

Der gefundenen Harnsäuremenge zählt man 3 *mg* für je 100 $cm^3$ Harn zu, um der Löslichkeit des Ammonurats Rechnung zu tragen.

*Wörners* Modifikation.[1]) In 150 $cm^3$ filtrierten Urins, dessen Azidität nicht mehr als höchstens 3 $cm^3$ Normalsäure für 150 $cm^3$ betragen darf und der, falls sie höher ist, vorher neutralisiert werden muß, werden unter Erwärmen auf 40—45° C 30 *g* Chlorammon aufgelöst. Nach $^1/_2$ bis 1 Stunde, in welcher Zeit alle Harnsäure als Ammonurat ausfällt und sich zum größten Teil zu Boden setzt, gießt man die über dem Niederschlag stehende trübe Flüssigkeit in ein zweites Gefäß, bringt den Niederschlag auf ein Filter, und filtriert nun die Mutterlauge durch das so gedichtete Filter. Auf diese Weise vermeidet man den Durchtritt des Niederschlages durchs Filter und erhält ein klares Filtrat. Etwa noch zurückbleibendes Ammonurat wird mit der Mutterlauge aufs Filter gebracht. Dann wird der Niederschlag mit 10%iger Ammonsulfatlösung gründlich bis zur Chlorfreiheit ausgewaschen; nun wird er auf dem Filter in 1—2%iger heißer Natronlauge gelöst und das Filter mehrmals mit heißem Wasser nachgewaschen. Filtrat und Waschwasser werden in eine Schale gebracht und auf dem Wasserbad, bis alles Ammoniak weg ist, erhitzt, dann in einen Kjeldahlkolben gebracht und der Harnsäurestickstoff nach *Kjeldahl* ermittelt.

## B. Isolierung und Identifizierung der Harnsäure und Purinbasen im Urin.[2])

Bei dem geringen Gehalt des Urins an Purinbasen ist es notwendig, große Mengen (mindestens 300 *l*) zu verarbeiten. Man fällt dann jede einzelne Portion und sammelt die erhaltenen Niederschläge zur gemeinsamen weiteren Verarbeitung.

Wie S. 885 beschrieben, wird der Harn siedend heiß mit Natriumbisulfit und Kupfersulfat ausgefällt, die Kupferoxydulverbindungen abfiltriert, mit heißem Wasser gewaschen und abgespritzt. Der in heißem Wasser suspendierte Niederschlag wird erwärmt, mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht, dann mit Salzsäure bis zur starksauren Reaktion versetzt, durch Schwefelwasserstoffgas zerlegt und die Lösung heiß filtriert. Die Hauptmenge der Harnsäure bleibt dabei auf dem Filter.

Das salzsaure Filtrat wird durch möglichst wenig Tierkohle entfärbt. Wenn es angeht, unterbleibt die Behandlung mit Tierkohle besser, da dieselbe beträchtliche Mengen der Basen zurückhält, zu deren Wiedergewinnung mehrmaliges Auskochen mit verdünnter Salzsäure nötig ist.

Die Lösung wird nunmehr auf dem Wasserbade möglichst weit eingedampft, zum Schlusse bei niederer Temperatur und unter häufigem Umschwenken der Schale oder besser während Darüberleiten eines kräftigen Luftstromes. Die im sirupösen Rückstand noch reichlich vorhandene Salzsäure wird durch zweimaliges Eindampfen mit Wasser und schließlich durch

[1]) *E. Wörner,* Ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Harnsäure auf Grund der Fällung als Ammonurat. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **29**. S. 70 (1900).

[2]) *M. Krüger* und *G. Salomon,* Die Alloxurbasen des Harns. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **26**. S. 350 (1898/99).

Eindampfen mit 96%igem Alkohol der Hauptmenge nach entfernt, bis die Masse grobpulverig geworden ist. Dieselbe wird mit Wasser bei 40° digeriert, nach mehrstündigem Stehen abfiltriert, mit Wasser salzsäurefrei, dann mit Alkohol und Äther gewaschen. Das Filtrat kann nochmals eingedampft und in derselben Weise behandelt werden; es bleibt aber beim Digerieren mit Wasser nur ein geringer Rückstand, der mit dem ersten vereinigt wird.

Der ungelöste Teil (Xanthinfraktion) besteht aus Xanthin, Heteroxanthin und 1-Methylxanthin; in die wässerige Lösung (Hypoxanthinfraktion) gehen über: Epiguanin, Adenin, Hypoxanthin und Paraxanthin sowie eine geringe Menge von Heteroxanthin und 1-Methylxanthin.

*a)* **Xanthinfraktion:** Trennung von Heteroxanthin, Xanthin und 1-Methylxanthin. Das Gemenge der drei Basen wird in der fünfzehnfachen Menge 3·3%iger, salzsäurefreier Natronlauge heiß gelöst. Innerhalb 24 Stunden scheidet sich das Natriumsalz des Heteroxanthins in reinem Zustand und fast vollständig aus. Je 60 $cm^3$ des auf 60° erwärmten Filtrates werden in ein vorher aufgekochtes kaltes Gemisch von 20 $cm^3$ konzentrierter Salpetersäure und 20 $cm^3$ Wasser langsam und unter Umrühren eingetragen. Hierbei wird der Rest der Harnsäure, welcher mit den Purinbasen in Lösung gegangen war, zerstört und innerhalb mehrerer Stunden scheidet sich beim Stehen in der Kälte salpetersaures Xanthin aus. Erweist sich dasselbe unter dem Mikroskop noch nicht als rein, so neutralisiert man je 3 *g* des lufttrockenen Rohproduktes unter Zugabe von wenig Wasser mit Natronlauge, erwärmt, löst das freie Xanthin durch mehr Lauge, verdünnt auf 60 $cm^3$ und behandelt die auf 60° erwärmte Lösung wie oben. Reines salpetersaures Xanthin setzt sich als schweres Kristallpulver in aus Blättchen bestehenden Drüsen ab. Zur Darstellung des freien Xanthins wird die ammoniakalische Lösung des Nitrates eingedampft, wobei sich die Base in amorphen Krusten abscheidet. Das 1-Methylxanthin wird aus dem salpetersauren Filtrate vom Xanthinnitrat durch Übersättigen mit Ammoniak und Eindampfen als atlasglänzende Masse, aus mikroskopischen Blättchen bestehend, erhalten. Der Rest kann durch ammoniakalische Silberlösung oder als Kupferoxydulverbindung gefällt werden.

*b)* **Hypoxanthinfraktion:** Trennung von Epiguanin, Adenin, Hypoxanthin und Paraxanthin. Die salzsaure, vom Xanthin und seinen Homologen abfiltrierte Lösung scheidet auf Zusatz von Ammoniak in gegeringem Überschuß sofort das Epiguanin in kleinen glänzenden Prismen aus. Das Filtrat wird durch Erhitzen vom Ammoniak befreit, die nicht zu konzentrierte Lösung in der Kälte vorsichtig mit 1·1%iger Pikrinsäurelösung im geringen Überschuß versetzt und das Adeninpikrat (siehe S. 895) sofort mit einer Saugvorrichtung abfiltriert. Nachdem das mit Schwefelsäure versetzte Filtrat durch Ausschütteln mit Benzol oder Toluol von überschüssiger Pikrinsäure befreit ist, wird die Gesamtmenge der noch vorhandenen Basen durch Kupfersulfat und Bisulfit oder ammoniakalische

Silberlösung gefällt, der Niederschlag durch Schwefelwasserstoffgas zersetzt und die wässerige Lösung der Basen eingedampft. Je 3 *g* des trockenen Rückstandes werden in 100 *cm*³ heißer verdünnter Salpetersäure (90 *cm*³ Wasser + 10 *cm*³ konzentrierter Salpetersäure) gelöst. Beim Erkalten scheidet sich Hypoxanthinnitrat in reinem Zustand aus (siehe S. 897).

Das Filtrat von diesem Körper enthält neben geringen Mengen Hypoxanthin noch den Rest von Heteroxanthin und 1-Methylxanthin sowie das Paraxanthin. Zu ihrer Trennung hat man die beschriebene Methode von Anfang an noch einmal in etwas einfacherer Weise zu wiederholen. Die Basen werden aus dem Filtrat als Kupferoxydul- oder Silberverbindungen gefällt und aus den Niederschlägen in der üblichen Weise isoliert. Die salzsaure Lösung derselben wird eingedampft und der Rückstand, wie oben angegeben, mit möglichst wenig kaltem Wasser extrahiert. Ungelöst bleiben Heteroxanthin und 1-Methylxanthin, welche durch 3·3%ige Natronlauge getrennt werden. Das Filtrat enthält Hypoxanthin und Paraxanthin. Aus dieser Flüssigkeit werden die Basen, um sie salzsäurefrei zu erhalten, wieder in Form ihrer Silber- und Kupferoxydulverbindungen niedergeschlagen und isoliert. Der Rückstand der (säurefreien) Basenlösung wird in der 15fachen Menge 10%iger Natronlauge gelöst. Beim Erkalten (am besten im Eisschrank) scheidet sich das Paraxanthinnatrium aus, aus welchem das freie Paraxanthin am besten durch Neutralisation der Lösung mit Essigsäure gewonnen werden kann. Aus dem Filtrat des Paraxanthins kann man endlich den letzten Rest Hypoxanthin gewinnen und, wie oben angegeben, als salpetersaures Salz identifizieren.

Guanin wurde von *Krüger* und *Salomon* im Harn nicht gefunden. Es könnte jedoch darin vorkommen. Es wird das, da sein salzsaures Salz nur zum Teil in Wasser disoziiert wird, aller Wahrscheinlichkeit nach in der Xanthin- und Hypoxanthinfraktion gefunden werden. Da das Guanin in Ammoniak unlöslich ist, so wird die Xanthinfraktion dasselbe, mit Ammoniak behandelt, ungelöst zurücklassen; in der Hypoxanthinfraktion wird es zugleich mit Epiguanin durch Ammoniak ausgeschieden und kann von letzterem durch Behandeln mit heißem Wasser oder heißem verdünnten Ammoniak getrennt werden.

Anhang. Bestimmung von Koffein und Theobromin im Urin.[1]) Koffein und Theobromin können nach reichlicher Verfütterung im Urin ausgeschieden werden. Da beide weder durch ammoniakalische Silberlösung noch durch Kupferoxydulsalze gefällt werden, so wird zur Isolierung dieser Basen der Harn mit Schwefelsäure angesäuert und mit Phosphorwolframsäure behandelt, so lange noch ein Niederschlag entsteht. Derselbe wird in der Kälte mit Barytwasser zersetzt, darauf Kohlensäure eingeleitet und jetzt erst die Flüssigkeit auf dem Wasserbad erwärmt und heiß filtriert. Im Hundeurin scheidet sich aus dem eingeengten Filtrat auf Zusatz von Schwefelsäure Kynurensäure aus. Im Filtrat werden Koffein und Theobromin von den anderen Purinbasen mit Hilfe von Kupfersulfat und Bisulfit ge-

[1]) *M. Krüger,* Über den Abbau des Kaffeins im Organismus des Hundes. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jg. 32. H. 15. S. 2818 (1899).

trennt (Trennung durch ammoniakalische Silberlösung nicht zu gebrauchen!). Das Filtrat von den Basen-Kupferoxydulverbindungen, welches das Theobromin und Koffein enthält, wird durch Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreit und nach dem Eindampfen auf ein geringes Volum mit Chloroform vollkommen erschöpft. Der Rückstand der chloroformischen Lösung, in Wasser gelöst, gibt (bei Anwesenheit von Theobromin) auf Zusatz von Silbernitrat eine Fällung, welche durch Ammoniak zunächst vermehrt, durch einen kleinen Überschuß desselben aber sofort gelöst wird. Nach dem Wegkochen des Ammoniak wird das Theobrominsilber von der erkalteten Flüssigkeit abfiltriert und das Filtrat, welches mit Salzsäure angesäuert war, wiederum mit Chloroform extrahiert. Der Rückstand des chloroformischen Auszugs enthält das Koffein.

Die Methode ist nach meiner Erfahrung auch sehr wohl brauchbar zur Gewinnung dieser Körper aus Organextrakten etc., die natürlich zuvor enteiweißt werden müssen. Man erhält quantitative Resultate.

## Bestimmung der Purinbasen in den Fäzes.

Harnsäure findet sich nur im Mekonium. In den Fäzes ist es nie vorhanden, vorausgesetzt, daß denselben nicht Urin beigemengt ist.

### *A.* Quantitative Methode.[1]

Der Kot (feucht oder getrocknet) wird zunächst durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure aufgeschlossen. Zu diesem Zweck erhitzt man denselben je nach der Menge in 1—2 *l* Wasser, dem 10—20 $cm^3$ konzentrierter Schwefelsäure zugefügt sind, mehrere Stunden über freiem Feuer. Die schwefelsaure Lösung wird durch Natronlauge deutlich alkalisch, dann mit 10 resp. 20 $cm^3$ Eisessig sauer gemacht und kurze Zeit auf dem Wasserbade erhitzt. Gleichzeitig werden zur Ausfällung des Kalkes 5 resp. 10 *g* Oxalsäure hinzugegeben. Nach dem Erkalten der Flüssigkeit wird sie auf ein bestimmtes Volumen, 1500 resp. 3000 $cm^3$, aufgefüllt, durch ein trockenes Faltenfilter vom körnigflockigen, sich leicht absetzenden Niederschlag abfiltriert und ein gemessener Teil des Filtrates zur Basenbestimmung verwendet. In den Fällen jedoch, wo der Niederschlag sehr groß erscheint, empfiehlt sich auch hier ein Auswaschen, indem man denselben mit heißem Wasser vom Filter spritzt, was leicht vonstatten geht, und noch einmal mit Natriumacetat und essigsaurem Wasser digeriert. Die vereinigten Filtrate brauchen nicht eingedampft zu werden; man nimmt nur für die weitere Behandlung entsprechend größere Mengen in Arbeit.

Ein gemessener Teil des essigsauren Filtrates, mindestens 500 $cm^3$, wird in einem Rundkolben zunächst mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht; dann gibt man pro 100 $cm^3$ je 10 $cm^3$ käufliche 40%ige Natriumbisulfitlösung hinzu und erhitzt zum Sieden. Die heiße Flüssigkeit versetzt

[1]) *M. Krüger* und *A. Schittenhelm*, Die Menge und Herkunft der Purinkörper in den menschlichen Fäzes. II. Mitt. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45. S. 14 (1905).

man weiterhin pro 100 *cm*³ mit je 10 *cm*³ 10%iger Kupfersulfatlösung und erhält sie noch wenigstens 3 Minuten im Sieden. Der flockige Niederschlag wird sofort durch ein Faltenfilter filtriert, mit heißem Wasser ausgewaschen und möglichst bald, um ein Auftrocknen desselben auf das Filter zu verhüten, mit heißem Wasser in den Fällungskolben zurückgespritzt. Man kann auch zweckmäßig den Niederschlag mitsamt dem Filter in den Kolben zurückbringen. Durch kräftiges Schütteln des Kolbeninhaltes mit Wasser wird der Kupferniederschlag so fein verteilt, daß die zersetzenden Mittel, Schwefelwasserstoff resp. Natriumsulfid, um so besser einwirken können. In jedem Fall wird die den Niederschlag enthaltende Flüssigkeit zum Sieden erhitzt und der Niederschlag darin heiß zerlegt (bei Verwendung von Natriumsulfid unter mehrere Minuten fortgesetztem Kochen). Dann säuert man mit 10%iger Essigsäure an, setzt das Sieden fort, bis das Kupfersulfid sich leicht in Flocken zusammenballt und die überstehende Flüssigkeit möglichst klar ist. Nachdem der Niederschlag von Kupfersulfid durch ein Saugfilter abfiltriert und mit heißem Wasser ausgewaschen ist, dampft man das Filtrat unter Zusatz von 10 *cm*³ 10%iger Salzsäure bis zur Trockene ein. Der Rückstand wird, um die Basen wieder in Lösung zu bringen, mit 5 *cm*³ Salzsäure und etwas Wasser auf dem Wasserbad digeriert.

Nach dem Erkalten filtriert man von dem geringen, aus Schwefel und braunen humusartigen Flocken bestehenden Rückstand ab und wäscht ihn mehrmals mit Wasser aus. In dem Filtrat, welches ca. 80 *cm*³ beträgt, können die Basen mit Hilfe der Kupfer- oder Silberlösung bestimmt werden. Die Fällungen geschehen in derselben Weise, wie es für den Harn beschrieben wurde (siehe S. 885, dort auch die notwendigen Lösungen), nur daß hier bei Abwesenheit von Harnsäure die Oxydation derselben mit Braunstein in essigsaurer Lösung wegfällt.

Am besten wendet man die Kupferfällung an. Das Filtrat wird zum Sieden erhitzt, mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und mit 10 *cm*³ Natriumbisulfitlösung angesäuert. Dann fügt man 5—10 *cm*³ 10%ige Kupfersulfatlösung hinzu, erhält die Flüssigkeit noch 3 Minuten im Sieden, filtriert durch ein Faltenfilter aus schwedischem Papier von J. H. Munktell Nr. 1, wäscht den Niederschlag mit heißem Wasser aus und bestimmt den Stickstoffgehalt desselben nach *Kjeldahl*. Daraus berechnet sich die Menge des Basenstickstoffes.

Nach derselben Methode kann auch in Organen, Nahrungsmitteln etc., die man natürlich vor dem Aufschließen mit verdünnter Schwefelsäure (3—5%) mit der Hackmaschine fein zerkleinern muß, der Purinbasengehalt bestimmt werden.

### *B.* Darstellung und Identifizierung der Purinbasen.[1]

Um den Nachweis sicher zu gestalten und genügend große Mengen zur Analyse zu erhalten, muß man die Fäzes von mehreren Wochen ver-

[1]) *M. Krüger* und *A. Schittenhelm,* Die Purinbasen der Fäzes. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35. S. 153 (1902).

arbeiten. Man muß ferner jeden Tag die Fäzes ganz frisch, da die Fäulnis die Basen rasch umwandelt und zerstört, sofort verarbeiten; man kann sie auch zur Trockene eindampfen und die getrockneten und pulverisierten Fäzes später vereint ebenso behandeln.

Die Tagesmenge an Kot wird mit 2 *l* Wasser und 15 $cm^3$ konzentrierter Schwefelsäure mehrere Stunden (2—3) über freier Flamme gekocht; dann wird die Lösung mit Natronlauge alkalisch und mit Essigsäure wieder sauer gemacht und nach dem Erhitzen filtriert. Im Filtrat werden die Basen wie bei der quantitativen Bestimmung mit Kupfersulfat und Bisulfit gefällt. Die Kupferoxydulniederschläge werden gesammelt, bis eine genügende Menge vorhanden ist.

Die gut ausgewaschenen, vereinigten Kupferoxydulniederschläge werden dann, in heißem Wasser suspendiert, durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Nachdem etwas Schwefelsäure zugefügt wurde, um etwa ausgeschiedenes Guanin in Lösung zu bringen, wird vom Kupfersulfid abfiltriert. Wenn das Filtrat noch stark gefärbt ist, kann es in der Wärme so lange mit basischem Bleiacetat behandelt werden, bis die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit nur mehr eine hellgelbe Farbe zeigt. Das Filtrat wird zunächst mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht, dann mit 100 $cm^3$ Natriumbisulfitlösung versetzt und vom entstandenen Niederschlag wiederum durch Filtrieren befreit. Aus der auf diese Weise erhaltenen Lösung werden die Basen nochmals durch Hinzufügen von Kupfersulfat ausgefällt.

Die Lösung der auf diese Weise erhaltenen Basen ist nur noch wenig gefärbt und bereitet bei der Isolierung der Basen keine Schwierigkeiten. Sie wird bis auf etwa 150 $cm^3$ eingedampft und in der Wärme mit 30 $cm^3$ 10%igen Ammoniaks im Überschuß versetzt. Der sofort entstandene Niederschlag von Guanin wird nach 24stündigem Stehen abfiltriert, noch einmal mit 2%igem Ammoniak in der Wärme digeriert, nach weiteren 24 Stunden wiederum abfiltriert und endlich zur Reinigung in verdünnter Natronlauge gelöst und durch Ansäuern der alkalischen Lösung mit Essigsäure wieder ausgefällt. Die Hauptmenge des Guanins wird zur Identifizierung in das in langen Prismen kristallisierende Sulfat ($C_5H_5N_5O . H_2SO_4 + 2H_2O$) übergeführt und als solches analysiert.

Die ammoniakalischen Filtrate vom Guanin werden nach Entfernung des Ammoniaks mit Salzsäure zur Trockene eingedampft und der Rückstand zur Beseitigung der überschüssigen Salzsäure noch einmal mit Wasser, dann mehrere Male mit Alkohol eingetrocknet.

Die Lösung der salzsauren Salze wird nunmehr nach Verdünnen mit Wasser auf etwa 150 $cm^3$ mit einer gesättigten Lösung von Natriumpikrat solange versetzt, als noch ein weiterer Zusatz des Fällungsmittels zu einem Teil des Filtrates sofort eine Trübung erzeugt. Der Niederschlag des pikrinsauren Adenins ($C_5H_5N_5 . C_6H_2(NO_2)_3OH$) wird sogleich mit Hilfe einer Saugvorrichtung abfiltriert. Das so erhaltene Adeninpikrat ist noch nicht rein, da das Natriumpikrat auch die Farbstoffe mitfällt. Zur exakten Feststellung des Gehaltes an Adenin empfiehlt es sich, in einem genau ab-

gewogenen Teil des lufttrockenen Präparates den Basengehalt mit Hilfe der Kupferoxydulfällung zu ermitteln und den Stickstoff dieser Fällung auf Adenin umzurechnen. Zur Reinigung für die Identifizierung wird das Adeninpikrat in heißem Wasser unter Zusatz der berechneten Menge Normalnatronlauge gelöst, dann die der Lauge entsprechende Menge Normalsalzsäure hinzugefügt und diese Lösung in der Hitze mit Tierkohle behandelt. Aus dem Filtrat scheidet sich dann beim Erkalten das Adeninpikrat in langen glänzenden Nadeln ab. Da von den natürlich vorkommenden Purinbasen nur vier, nämlich Guanin, Adenin, Hypoxanthin und Epiguanin, Pikrate geben, welche sich zum Teil schon durch ihre Kristallform voneinander unterscheiden, von denen außerdem die des Adenins und Epiguanins bei bestimmten Temperaturen liegende Zersetzungspunkte haben, so ist zur Identitätsbestimmung des Adeninpikrates eine Analyse nicht unbedingt notwendig und es genügt die Ermittlung des Zersetzungspunktes. Derselbe liegt bei 281°. Vermengt man das vorliegende Produkt mit reinem Adenin anderer Herkunft, so darf sich der Schmelzpunkt nicht verändern.

Der Rest der neben Guanin und Adenin vorhandenen Basen wird aus dem Filtrate von Adeninpikrat durch Kupfersulfat und Natriumbisulfit gefällt. Der gut ausgewaschene Niederschlag (mehrmaliges Auskochen) liefert nach dem Zersetzen mit Schwefelwasserstoff ein Basengemenge, welches aus Xanthin und Hypoxanthin besteht. Nach dem Entfärben durch Tierkohle wird das Gemenge mit Salzsäure eingedampft und der Überschuß von Säure in der eben angegebenen Weise beseitigt. Die Lösung des Rückstandes, welcher neben den salzsauren Salzen freies Xanthin enthält, in wenig Wasser, scheidet nach längerem Stehen im Eisschrank Xanthin aus. Das Filtrat hinterläßt nach dem Eindampfen einen Rückstand, welcher der Hauptsache nach aus salzsaurem Hypoxanthin neben den Spuren in Lösung gebliebenen Xanthins besteht.

Das Xanthin löst man unter Erwärmen in einem kleinen Überschuß von Normalnatronlauge, verdünnt etwas mit Wasser und filtriert die auf 60° erwärmte Lösung langsam in ein vorher aufgekochtes kaltes Gemisch von 20 $cm^3$ konzentrierter Salpetersäure und 20 $cm^3$ Wasser unter ständigem Umrühren. Reines salpetersaures Xanthin scheidet sich als schweres Kristallpulver in charakteristischer Kristallform (aus feinen Blättchen bestehende Drüsen) ab. Löst man das Xanthinnitrat in Ammoniak und engt stark ein, so erhält man das Xanthin als schuppige Haut. Zur Analyse filtriert man dieses ab, wäscht mit Alkohol und Äther und trocknet bei 100°; eventuell muß es nochmals über das Nitrat in gleicher Weise gereinigt werden. Ist das Xanthin zu wenig zur Analyse, so löst man es im Ammoniak, gibt ammoniakalische Silberlösung zu, wobei ein gallertiger Niederschlag von $C_5 H_4 N_4 O_2 . Ag_2 O$ ausfällt, der sich in Salpetersäure löst und salpetersaures Xanthinsilberoxyd $C_5 H_4 N_4 O_2 . Ag NO_3$ gibt, welches sich bei Verdünnung langsam in charakteristischen kugligen Aggregaten kleiner Nadeln abscheidet.

Das Hypoxanthin wird zunächst mit Hilfe seines pikrinsauren Salzes gereinigt, weil bei Überführung in das salpetersaure Salz zu befürchten ist, daß das noch beigemengte Xanthin durch die Salpetersäure gleichfalls mit niedergeschlagen wird. Man verfährt in folgender Weise: Das salzsaure Hypoxanthin wird zusammen mit einem kleinen Überschuß freier Pikrinsäure in etwa 50 $cm^3$ heißem Wasser gelöst. Beim Abkühlen trübt sich die Lösung gleichmäßig, wenn noch Adenin vorhanden war. Die Trübung ballt sich beim Schütteln der Flüssigkeit leicht in Flocken zusammen, welche sofort mit einer Saugvorrichtung abfiltriert werden. Das klare Filtrat scheidet dann nach dem Einengen und Erkaltenlassen das Hypoxanthinpikrat ($C_5H_4N_4O \cdot C_6H_2[NO_2]_3OH$) in makroskopischen tafelförmigen Kristallen aus, welche mit keinem Pikrat einer anderen Purinbase zu verwechseln sind. Zur Überführung in das salpetersaure Salz wird das Pikrat in Wasser unter Zusatz von Salpetersäure gelöst und die Pikrinsäure durch Ausschütteln mit Benzol oder Toluol entfernt. Beim Eindampfen der salpetersauren Lösung scheidet sich dann das Nitrat ($C_5H_4N_4O \cdot HNO_3 + H_2O$) in wetzsteinförmigen Kristallen aus. Dieses Salz kann zur Analyse benutzt werden.

Diese Methode kann auch zur **Bestimmung und Identifizierung der Purinbasen in Organen**, wie Muskeln, Pankreas, Milz etc., benutzt werden. Je nach der in ihnen vorhandenen Purinbasenmenge nimmt man davon $^1/_2$, 1, 2 und mehr Kilogramme. Dieselben werden mit der Fleischhackmaschine fein zerkleinert, in Portionen von $^1/_2$ *kg* in je 2 *l* 3—4%iger Schwefelsäure suspendiert und ca. 4—5 Stunden am Rückflußkühler über freier Flamme gekocht. Dann wird genau so verfahren wie bei den Fäzes.

Nach Entfernung des Guanins kann man dabei versuchen, ob aus der Lösung des aus den salzsauren Salzen der Basen bestehenden Gemenges entsprechend dem Trennungsverfahren von *Krüger* und *Salomon* (siehe S. 890) sich nach mehrstündigem Stehen im Eisschrank Xanthin ausscheidet. Fällt es aus, so wird es abfiltriert und mit dem Rest des später noch gefundenen Xanthins zusammen verarbeitet.

## B. Allantoin.

Als Allantoinbestimmung wurde seither zumeist die von *Loewi* angegebene und auf der Fällung mit Silbernitrat bei schwach alkalischer Lösung beruhende Methode benutzt. Sie hat sich jedoch namentlich in quantitativer Hinsicht nicht bewährt. In neuester Zeit ist nun von *Wiechowski*[1]) ein Verfahren ausgearbeitet worden, welches für Säugetierurin (Hund, Kaninchen, Schwein etc.) brauchbare Resultate gibt und relativ einfach zu handhaben ist. Allerdings gibt sie nach meiner Erfahrung am Hundeurin etwas zu hohe Werte: doch ist der Fehler so gering, daß er praktisch kaum in Betracht kommt.[2]) Immerhin kann er, wie *Abderhalden* und *Einbeck*[3])

[1]) *W. Wiechowski*, Die Bedeutung des Allantoins im Harnsäurestoffwechsel. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **9**. S. 109 (1908).

[2]) *A. Schittenhelm*, Über die Umsetzung verfütterter Nukleinsäure beim Hunde unter normalen und pathologischen Bedingungen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 62. S. 80 (1909).

[3]) *L. Abderhalden* und *H. Einbeck*, Studien über den Abbau des Histidins im Organismus des Hundes. Zeitschr. f. physiolog. Chemie. Bd. **62**. S. 322 (1909).

betonen, unter Umständen (z. B. bei Verfütterung von Histidinmonochlorhydrat) einen störenden Grad erreichen, weshalb sie die Methode abänderten durch Kombination mit einer ebenfalls von *Wiechowski* angegebenen späteren Methode.[1]) Die letztere arbeitete *Wiechowski* vor allem für menschlichen Urin aus, da für ihn seine frühere Methode, wie er selbst erkannte, nicht brauchbar ist, indem andere stickstoffhaltige Körper dem Allantoinquecksilberniederschlag sich beimengen und, obwohl im menschlichen Urin höchstens Spuren von Allantoin (3—4 *mg* in 1 *l*) anzutreffen[2]) sind, eine reichliche Allantoinausscheidung vorgetäuscht wird. Die neue Methode ist für den menschlichen Urin namentlich zum Nachweis von Allantoin durch Darstellung desselben gut brauchbar; zur quantitativen Bestimmung, wobei der Stickstoffgehalt des Quecksilber-Allantoinniederschlags als Maß für die ausgeschiedene Allantoinmenge eruiert wird, ist auch sie für den menschlichen Urin zunächst noch nach meiner Erfahrung nur mit Vorsicht zu verwerten.

## *Wiechowskis* Methode zum Nachweis von Allantoin im Tierharn.

Prinzip. Die Methode beruht auf der Fällung des Allantoins durch Quecksilberacetatlösung bei Anwesenheit von viel Natriumacetat.

Erforderliche Chemikalien. 1. 8%ige Schwefelsäure; 2. 10%ige Phosphorwolframsäure (Merck); 3. Bleikarbonat; 4. Bleiacetatlösung; 5. Silberacetatlösung; 6. Quecksilberacetatlösung, welche dargestellt wird, indem käufliches essigsaures Quecksilber (Merck) zu 1% in Wasser gelöst, bis zur Sättigung reines Natriumacetat eingetragen und mit Wasser soweit verdünnt wird, daß der Gehalt an Quecksilberacetat 0·5% beträgt.

Ausführung. Von dem auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllten Urin nimmt man eine genau abgemessene, nicht zu kleine Menge (vom Kaninchenurin ca. die Hälfte, vom Hundeurin ein Drittel der Tagesmenge; beide werden vorher gehörig verdünnt, Kaninchenurin auf ca. 150, Hundeurin auf 300; doch kann man beruhigt stärker verdünnen und eventuell weniger zur Allantoinbestimmung nehmen, wenn man auf andere Harnbestandteile gleichfalls analysieren will).

Für die Allantoinbestimmung werden 100 $cm^3$ mit 10 $cm^3$ etwa 8%iger Schwefelsäure versetzt, mit der gerade ausreichenden (durch Austasten vorher ermittelten) Menge 10%iger Phosphorwolframsäure in einen Meßkolben von passender Größe (250—300 $cm^3$) gefüllt und mit Wasser bis zur Marke ergänzt. Nach mindestens einstündigem Stehen wird durch ein dichtes Faltenfilter in eine Schale filtriert und das klare, meist tiefdunkel gefärbte Filtrat unter Verreiben so lange mit Bleikarbonat versetzt, bis

[1]) *W. Wiechowski*, Das Vorhandensein von Allantoin im normalen Menschenurin und seine Bedeutung für die Beurteilung des menschlichen Harnsäurestoffwechsels. Biochem. Zeitschr. Bd. **19**. S. 368 (1909).

[2]) *W. Wiechowski*, l. c.; *A. Schittenhelm* und *K. Wiener*, Über das Vorkommen und die Bedeutung von Allantoin im menschlichen Urin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **63**. S. 283 (1909).

keine Kohlensäureentwicklung mehr stattfindet und die Flüssigkeit nur schwach oder gar nicht sauer mehr reagiert.[1]) Hierauf wird von den ungelösten Bleisalzen auf der Nutsche scharf abgesaugt, ein rundes (mit der Pipette abgemessenes), möglichst großes Volumen des manchmal noch schwach blaugefärbten, aber stets neutralen Filtrates, wenn es sich an einer vorher angestellten Probe als nötig erweist, was keineswegs immer der Fall ist, unter Vermeidung eines Überschusses mit der durch Austasten ermittelten Menge Bleiessiglösung im Meßkolben gefällt und das fehlende Flüssigkeitsvolumen durch Wasser ersetzt. Das Filtrat von der Bleifärbung wird mit Schwefelwasserstoff behandelt und das Filtrat vom Bleisulfid mit der Luftpumpe vom gelösten Schwefelwasserstoff befreit. Bei Anwesenheit von Chlor wird dann ein aliquoter runder Teil (wieder mit der Pipette abzumessen) dieses von freier Essigsäure sauren Filtrates, wenn nötig, mit Silberacetatlösung zur Entfernung des Chlors wieder im Meßkolben gefällt und Wasser bis zur Marke nachgegossen. Das Filtrat vom Chlorsilber wird in derselben Weise wie das von der Bleifällung mit Schwefelwasserstoff und das vom ausgeschiedenen Silbersulfid mit Luft behandelt. In diesem essigsauren letzten Filtrat überzeugt man sich stets von der Vollständigkeit der vorgenommenen Fällungen durch Versetzen kleiner Portionen mit Phosphorwolframsäure, Bleiessig und Silbernitrat. Fallen diese Reaktionen absolut negativ aus, so wird in zwei runden aliquoten Teilen nach vorausgegangener genauester (sehr wichtig!) Neutralisation mit chlorfreier (aus Natrium bereiteter) Natronlauge die Allantoinfällung mit einer reichlichen Menge der Quecksilberacetat-Natriumacetatlösung vorgenommen. Nach mindestens einstündigem Stehen[2]) werden die gebildeten Niederschläge aufs Filter gebracht, wobei man in einer Filtratprobe sich durch weiteren Reagenz- bzw. Allantoinzusatz von der Vollständigkeit der Fällung überzeugt, und bis zum Verschwinden der Fällung bzw. Gelbfärbung des Filtrates durch Schwefelnatrium mit Wasser gewaschen. Die eine Probe wird nun der Stickstoffbestimmung nach *Kjeldahl* unterworfen und aus der erhaltenen Stickstoffmenge unter Berücksichtigung der verschiedenen angewandten Volumina (Harnvolumen, Volumen nach Zusatz von Phosphorwolframsäure, nach Zusatz von Bleiessig, nach Zusatz von Silberacetat) die Gesamtmenge des Allantoinstickstoffes resp. Allantoins berechnet.

Der Niederschlag der zweiten Probe wird in ein Becherglas gespritzt und unter Erhitzen bis zum Sieden in die Flüssigkeit bis zur völligen Zersetzung des Niederschlages Schwefelwasserstoff eingeleitet. Auf dem Wasserbad wird darauf zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit

[1]) Man nimmt nach meiner Erfahrung am besten einen kräftigen Überschuß von Bleikarbonat und läßt das Gemisch unter öfterem Umrühren längere Zeit 1 Stunde und mehr stehen.

[2]) Bei kleinen Allantoinmengen stellt sich zunächst nur eine leichte Trübung ein, die sich allmählich verdichtet und nach mehreren Stunden erst als Niederschlag absetzt. Es scheint nach meinen Erfahrungen daher absolut geraten, die Fällung, namentlich wenn sie klein ist, mehrere Stunden stehen zu lassen.

Wasser digeriert, quantitativ in einen kleinen Meßkolben übertragen und das Volumen (meist 25 *cm*³, bei viel Allantoin 50 *cm*³) mit Wasser ergänzt. Die schließlich folgende Filtration wird durch sehr dichtes Material vorgenommen und eventuell so lange wiederholt, bis das Filtrat völlig klar ist. Ein rundes Volumen desselben wird auf gewogener Schale verdampft. Diese bei 100° getrocknet und gewogen. Hieraus wird wiederum unter Berücksichtigung der angewandten Volumina die Gesamtmenge berechnet.

Der Rest des Filtrates dient zum Reinheits- bzw. Identitätsnachweis. Sind die Allantoinkristalle gefärbt, so kann man sie mit wenig 3%igem Wasserstoffsuperoxyd lösen und auf dem Wasserbad wieder zur Trockene bringen, wodurch sie ganz farblos werden. Entweder unmittelbar oder nach einmaligem Umkristallisieren wird der Schmelzpunkt des erkaltenen Produktes bestimmt (S. P. bei 230—234°); eine kleine Probe wird auf dem Platinblech verbrannt.

Will man genaue Resultate haben, so ist wegen der mehrfachen Volumenmessungen unbedingt nötig, nachgeaichte und übereinstimmende Pipetten und Meßkolben zu benutzen und andrerseits in nach Möglichkeit großen Volumen zu arbeiten. Arbeitet man mit der nötigen Genauigkeit und befolgt die Vorschrift aufs peinlichste, so erhält man gute Resultate. — Die Methode kann selbstverständlich auch zur Darstellung von Allantoin aus Harn verwandt werden.

*Wiechowskis* Methode zum Nachweis von Allantoin im Menschenharn.[1])

Prinzip: Die Methode beruht auf dem nämlichen Prinzip wie die Allantoinbestimmung im Tierharn.

Vorbemerkung: Frischer, wenig Ammoniak enthaltender Urin kann ohne weiteres zur Bestimmung genommen werden. Enthält der Urin jedoch viel Ammoniak, so muß dasselbe, weil es für die weitere Fällung hemmend und darum störend wirkt, vorher entfernt werden. Hierzu wird zunächst die zur Bestimmung bestimmte Urinmenge bei schwach saurer Reaktion zum dünnen Sirup auf dem Wasserbad eingeengt und hierauf zur Entfernung des Ammoniaks mit viel Mg O verrührt, mit dem mehrfachen Volumen Alkohol versetzt, vom Unlöslichen abgenutscht, mit Alkohol nachgewaschen und das Filtrat auf dem Wasserbad bis zur Trockene eingedampft. Hierbei wird fast alles Ammoniak entfernt, die anfangs alkalische Flüssigkeit wird neutral (bis schwach sauer). Der Rückstand wird nun in wenig Wasser gelöst und, wie folgt, weiter behandelt.

Ausführung: Vom menschlichen Urin nimmt man wegen seines minimalen Gehaltes an Allantoin meist zweckmäßig 1 *l* (vom Tierurin, an dem die Methode selbstverständlich gleichfalls verwandt werden kann, 100 bis 200 *cm*³). Vor der ersten Fällung mit 20%iger Merkuronitratlösung wird zur Vermeidung eines Überschusses an einer weiteren Harnportion vorher in 2 *cm*³ betragenden Mengen die gerade völlig ausfällende Menge auf $^1/_{10}$ *cm*³ genau ausgetastet. Dann erst wird das Versuchsquantum mit der nötigen

[1]) l. c.; siehe auch *W. Wiechowski*, Über die Zersetzlichkeit der Harnsäure im menschlichen Organismus. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak. Bd. **60**. S. 193 (1909).

Menge Merkuronitrat versetzt. Der Niederschlag ist sehr mächtig und soll gründlich gewaschen werden (bis das Filtrat nicht mehr mit Merkurinitrat reagiert). Das Filtrat, das sich beim Stehen meist noch gelblich trübt, wird samt den Waschwässern mit Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit, das ausgefällte Quecksilbersulfid gut ausgewaschen und die erhaltene Flüssigkeit nach genauer Neutralisierung mit chlorfreier Sodalösung so lange mit 20%iger Merkurinitratlösung versetzt, bis das Filtrat auf Zusatz weniger Tropfen einer frischen verdünnten (ca. 0·1%) Allantoinlösung mit Bildung einer weißen Fällung reagiert. Die hierzu nötige Menge tastet man vorher in kleinen Voluminis aus. Es zeigt sich, daß schon nach relativ geringem Zusatz (meist $^1/_{20}$–$^1/_{10}$ Volumen) dieser Punkt erreicht ist, bei dem man sicher sein kann, alles Allantoin gefällt zu haben. Durch den so bemessenen Merkurinitratzusatz wird neben allem Allantoin ein geringer Teil des vorhandenen Harnstoffes, Ammonsalze und organische basische Verbindungen, welche der Merkuronitratfällung entgangen waren, gefärbte Substanzen etc. niedergeschlagen. Nach 24stündigem Stehen wird der Niederschlag quantitativ auf ein Faltenfilter gesammelt, einige Male mit Wasser (eventuell bis zur beginnenden kolloidalen Lösung) gewaschen, samt dem Filter im Wasser verteilt, durch Schwefelwasserstoff in der Kälte zersetzt, der Schwefelwasserstoff durch Luft verdrängt, das Quecksilbersulfid abfiltriert und gründlich ausgewaschen (bis das Filtrat nicht mehr mit Merkurinitrat reagiert); Filtrat und Waschwässer werden genau neutralisiert und auf dem Wasserbad je nach der Menge des in Arbeit genommenen Harns auf ein Volumen von 20—100 $cm^3$ eingeengt. Nun wird, wie für den Tierharn beschrieben, weiter verfahren, nur mit dem Unterschied, daß, da die Flüssigkeit chloridfrei ist, die Fällung mit Silberacetat wegbleibt. Die meist tiefdunkelgefärbte Flüssigkeit wird mit 50%iger Phosphorwolframsäurelösung[1]) bei Anwesenheit von 10%iger Schwefelsäure genau gefällt. Filtrat und Waschung, die mit 5%iger Phosphorwolframsäurelösung vorgenommen wird, durch Bleioxyd neutralisert, hierauf, wenn nötig, noch 20%iger Bleiessig bis zur völligen Ausführung zugefügt, auf der Nutsche filtriert und gewaschen, Filtrat und Waschwässer mit Schwefelwasserstoff entbleit, der Schwefelwasserstoff ausgeblasen, Filtrat und Waschwässer vom Bleisulfid mit Sodalösung genau neutralisiert und mit einem Überschuß des Quecksilberacetatgemisches gefällt. Nun läßt man absetzen, sammelt den Niederschlag auf einem glatten Filter und wäscht ihn so lange, bis das Filtrat nicht mehr mit Merkurinitrat reagiert. Der Niederschlag wird

---

[1]) Man braucht nur wenig Phosphorwolframsäurelösung. Die Fällung filtriert auf der Nutsche klar, das Waschen macht jedoch Schwierigkeiten, da bald kolloidale Lösung eintritt. Man kann dies vermeiden, wenn man auf dem Filter eine dünne Schicht gut geglühter Kieselgur ausbreitet. Das Kieselgur wird in Wasser suspendiert, etwas Schwefelsäure zugesetzt und nach dem Absetzen gröberer Partikel die Suspension auf das Filter gegossen, scharf abgesaugt und einigemal mit Wasser nachgewaschen. Die Kieselgurschicht liegt fest an, wird nicht rissig und durch Aufgießen nicht aufgewirbelt. Ein solches Filter verhindert die kolloidale Lösung vollständig; es hat sich *Wiechowski* zu diesem und vielen anderen Zwecken bewährt.

in ein Becherglas gespritzt und in der Hitze mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Da das meiste Quecksilbersulfid kolloidal ist, so verdampft man die ganze Zersetzungsflüssigkeit in einer Glasschale auf dem Wasserbad zur Trockene, wobei das Schwefelquecksilber ausflockt. Man behandelt den Rückstand mit heißem Wasser, gießt durch ein kleines Filter, wäscht aus und engt in einer kleinen geradwandigen Schale auf ein kleines Volumen (2—5 $cm^3$) ein. Die Flüssigkeit ist dunkelgelb gefärbt; sie wird mindestens mit dem gleichen Volumen einer 3%igen Auflösung von Quecksilbersulfat in 10%iger Schwefelsäure versetzt. Nach dem Absitzen des meist reichlichen gelblichen Niederschlages filtriert man, wäscht aus, entfernt aus dem Filtrat durch Schwefelwasserstoff das Quecksilber, aus dem nächsten Filtrat den Schwefelwasserstoff durch Luft, filtriert, wäscht, neutralisiert und fällt das Allantoin noch einmal mit der 0·5%igen Quecksilberacetatlösung. Dieser Niederschlag wird genau so behandelt wie der zuerst erzeugte. Nach dem Zersetzen wird wieder zur Trockene verdampft, in heißem Wasser gelöst, filtriert, gewaschen und auf ein kleines Volumen eingeengt. Diese nunmehr sehr wenig gefärbte Flüssigkeit behandelt man mit ein paar Tropfen 50%iger Phosphorwolframsäure und das Filtrat mit Bleiessig, wobei man genau so verfährt wie bei den ersten Fällungen. Fällung und Filtration sind in kleinsten, dem Volumen von 2—5 $cm^3$ entsprechenden Gefäßchen mit ebensolchen Filtern vorzunehmen, ihre möglichste Konzentration zu wahren, da nur bei dieser die verunreinigenden Substanzen niedergeschlagen werden. Nach Entfernung des Bleies durch Schwefelwasserstoff und Neutralisation wird das Allantoin das dritte Mal gefällt, der Niederschlag zersetzt, das Filtrat zur Trockene verdampft, im heißen Wasser gelöst, filtriert und nunmehr auf etwa 0·2—0·3 $cm^3$ in kleinsten Schalen eingeengt. Dabei kristallisiert das Allantoin in wohlausgebildeten Kristallen aus. Dieses wird auf einem kleinen gehärteten Filter gesammelt, mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 100° getrocknet.

Charakterisierung des Allantoins: Es schmilzt unter Zersetzung bei 230 bis 232°, verbrennt ohne Rückstand, ist schwer in Wasser löslich. Die Lösung reagiert nicht mit Phosphorwolframsäure, Bleiessig, Merkuronitrat und Merkurinitrat in schwefelsaurer Lösung; dagegen entsteht mit Merkurinitrat, mit Quecksilberacetat in Natriumacetatlösung und mit Silbernitrat + wenig Ammoniak eine flockige Fällung.

### Kombination beider Methoden nach Angaben von *Abderhalden* und *Einbeck*.[1])

Die Methode wurde am Hundeharn angewandt. 200 $cm^3$ des auf 500 $cm^3$ aufgefüllten Tagesharns wurden bei schwachsaurer Reaktion auf dem Wasserbad bis zum dünnflüssigsten Sirup eingedampft. Der Rückstand wird mit Magnesiumoxyd zu einem dicken Brei verrieben. Diesen rührt man mit viel Alkohol gründlich durch, nutscht ab und wäscht den Rückstand vier- bis fünfmal mit Alkohol sorgfältig nach. Die alkoholische Lösung wird auf dem Wasserbad fast bis zur Trockene verdampft und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die Lösung füllt man nun in einen Meßkolben von

[1]) l. c.

250 $cm^3$, gibt 10 $cm^3$ 8%iger Schwefelsäure und so viel von einer 10%igen Lösung von Phosphorwolframsäure hinzu, bis keine Fällung mehr erfolgt. Dann wird auf 250 $cm^3$ aufgefüllt; von diesen werden 200 $cm^3$ der filtrierten Lösung zur Allantoinbestimmung nach der *Wiechowski*schen Methode für den Tierharn verwandt.

## Anhang. Untersuchung der Harnsteine.

Die meisten Harnsteine bestehen aus Harnsäure und deren Salzen (Uratsteine); sie sind braun gefärbt und sehr hart. Hin und wieder kommen auch kleinere aus harnsaurem Ammon bestehende Konkremente vor, die hell und relativ weich sind.

In einigen Fällen sind Steine aus Xanthin beobachtet, die ebenfalls hart sind.

Häufig finden sich Steine aus oxalsaurem Kalk (Oxalatsteine). Sie sind die härtesten Harnsteine. Die kleineren haben eine glatte, die größeren eine höckerige Oberfläche (deshalb Maulbeersteine genannt); die letzteren sind meist durch Blutfarbstoff dunkelbraun gefärbt. Die Oxalatsteine haben einen kristallinischen Bruch.

Ebenfalls häufig finden sich Phosphatsteine aus phosphorsaurem Kalk, phosphorsaurer Magnesia und phosphorsaurer Ammoniakmagnesia. Sie sind weich, brüchig und blättern leicht ab.

Zu den seltenen Steinen gehören die Karbonatsteine, welche aus kohlensaurem Kalk bestehen und weich, weiß und bröckelig sind, ferner die Cystinsteine, welche klein, ziemlich platt und weich sind. Ähnlich verhalten sich die gleichfalls seltenen Tyrosin- und die Cholesterinsteine. Sehr selten beobachtet man auffallend leichte und knetbare Konkremente im Urin (Urostealithe); sie bestehen aus Fett, daneben enthalten sie auch Kalk- und Magnesiaseifen sowie Eiweiß.

Die Steine sind nicht immer einheitlich; sie zeigen manchmal Schichten verschiedener Zusammensetzung. Zur Untersuchung zerstößt und verreibt man sie in einer Reibschale.

Untersuchung. Die erste Frage ist, ob die Konkremente aus anorganischer oder organischer Substanz bestehen. Zu ihrer Entscheidung erhitzt man eine kleine Probe auf dem Platinspatel oder im Porzellantiegel über freier Flamme; organische Substanz verbrennt dabei unter Entwicklung eines üblen Geruches, anorganische bleibt als Asche zurück. Über die Art der Asche, welche man bei reichlich vorhandenem Material nach den Bd. I, S. 374 entwickelten Prinzipien analysieren kann, vermag man sich bei wenig Material eine schnelle und genügende Orientierung unter den folgenden Gesichtspunkten zu verschaffen. Uratsteine hinterlassen etwas Asche, die sich leicht in Wasser löst und alkalisch reagiert (K, Na); man entscheidet durch die Flammenreaktion, ob Kalium oder Natrium vorliegt. Oxalatsteine hinterlassen eine Asche, welche aus $CaO$ und $CaCO_3$ besteht, in Wasser unlöslich ist und mit verdünnter Salzsäure sich unter

leichtem Aufbrausen löst. Gibt man nun zu der Lösung oxalsaures Ammon, so fällt das Calcium als oxalsaurer Kalk in charakteristischer Kristallform aus (Briefkuvertform). Die Asche der Phosphatsteine, welche aus phosphorsaurem Kalk und phosphorsaurer Magnesia besteht, ist gleichfalls in Wasser unlöslich; sie löst sich ohne Aufbrausen in verdünnter Salzsäure. Man prüft nun auf Phosphorsäure, indem man eine Lösung von molybdänsaurem Ammon zugibt und erwärmt; bei Gegenwart von Phosphorsäure bildet sich sofort oder beim Erkalten ein gelber kristallinischer Niederschlag von phosphormolybdänsaurem Ammon; hat man den Kalk durch Zusatz von oxalsaurem Ammon entfernt, so weist man Magnesia nach, indem man das saure Filtrat ammoniakalisch macht und eventuell etwas Phosphat in Lösung zusetzt; nach einiger Zeit fällt dann ein weißer Niederschlag von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia aus. Die Asche der Karbonatsteine löst sich in verdünnter Salzsäure unter starkem Aufbrausen. Beimengung von schwefelsaurem Kalk (Gips), der beim Veraschen unverändert zurückbleibt, erkennt man daran, daß der Rückstand, in Wasser gelöst (schwer löslich), mit Barytwasser einen Niederschlag von schwefelsaurem Baryum gibt. — Wenn man bei der Veraschungsprobe erkennt, daß das Konkrement im wesentlichen aus anorganischem Material besteht, so kann man selbstverständlich die analytischen Versuche auch am Steinpulver direkt anstellen.

Enthält der Stein reichlich organische Substanz, so prüft man zunächst auf Harnsäure. Hierzu dient die Murexidprobe. Zu ihrer Anstellung kann man das Steinpulver direkt nehmen oder man erwärmt eine kleine Menge mit verdünnter Salzsäure, läßt erkalten und stellt die Probe mit dem ungelösten Rückstand an: die Substanz wird in eine kleine Porzellanschale gebracht, einige Tropfen konzentrierter Salpetersäure darauf getan und nun unter vorsichtigem Erhitzen über freier Flamme und beständigem Umschwenken langsam verdampft; dabei färbt sich die Masse zunächst gelb und bei Anwesenheit von Harnsäure nach völligem Abdampfen schön rot. Hält man nun die Schale über konzentriertes Ammoniak, so tritt unter der Einwirkung der Ammoniakdämpfe eine schöne purpurrote Farbe auf, welche, mit einem kleinen Tropfen Natronlauge betupft, in eine prachtvoll blauviolette Farbe übergeht. Nicht zu stark erhitzen!

Im Gegensatz zu Harnsäure löst sich Xanthin leicht in Ammoniak, aus dem es durch ammoniakalische Silberlösung leicht ausgefällt werden kann. Von der ammoniakalischen Lösung dampft man durch Einengen das Ammoniak ab; es hinterbleibt das Xanthin. Hiermit stellt man die Xanthinproben an: 1. Mit Salpetersäure abgedampft, gibt eine Probe Xanthin einen gelben Rückstand, der sich in Ammoniakdampf nicht rötet, sich aber bei Zugabe eines Tropfens Lauge rot und, wenn nun erhitzt wird, purpurrot färbt. 2. Kocht man Xanthin mit Salzsäure und wenig chlorsaurem Kali, verdampft auf dem Wasserbad zur Trockene und hält den Rückstand über konzentriertes Ammoniak, so färbt es sich dunkelrot (*Kossel-Fischer*sche

Reaktion[1]); beruht auf Murexidbildung). 3. Bringt man in ein Uhrglas etwas Chlorkalk in Natronlauge, rührt um und gibt etwas Xanthin zu, so bildet sich um jedes Körnchen ein dunkelgrüner, sich dann braun färbender Ring, der endlich wieder verschwindet.

Cystin löst sich in Salzäure und etwas schwerer in Ammoniak. Gibt man zu der ammoniakalischen Lösung vorsichtig Essigsäure bis zur neutralen Reaktion, so fällt es in charakteristischen sechseckigen Tafeln aus. Löst man diese nach Abfiltrieren in Natronlauge, gibt etwas Bleiacetat zu und kocht, so findet eine Zersetzung des schwefelhaltigen Cystins statt und es gibt infolge Bildung von Schwefelblei eine schwarze Färbung. In einem Fall ist neben Cystin in demselben Stein Tyrosin beobachtet worden.[2]) Man erkennt dasselbe daran, daß die Substanz mit *Millons* Reagenz eine starke Rotfärbung gibt und aus wässeriger Lösung in Nadeln kristallisiert.

Lösen sich die Steine im Äther oder Chloroform, so handelt es sich um Konkremente, die aus Fett oder Cholesterin bestehen. Fett hinterläßt beim Abdampfen auf Papier einen Fettfleck; Cholesterin kommt beim Abdampfen in charakteristischen glänzenden Plättchen zum Vorschein. Setzt man zur chloroformischen Lösung konzentrierte Schwefelsäure, so entsteht bei Anwesenheit von Cholesterin eine Rotfärbung. Fett und Cholesterin können zusammen in einem Konkrement vorkommen. Man verseift dann das Fett mit alkoholischer Kalilauge, dampft zur Verjagung des Alkohols ein, nimmt den Rückstand mit Wasser auf und schüttelt die Seifenlösung mit Äther aus. Beim Verdampfen der ätherischen Lösung bleibt Cholesterin zurück. Die aus Fett bestehenden Urosthealithe können ferner noch ein Gerüst von in Wasser unlöslichen Seifen (Kalk- und Magnesiaverbindungen mit Fettsäuren) enthalten, die durch Salzsäure zerlegt werden und freie Fettsäuren liefern.[3])

---

[1]) Man nennt diese Reaktion zumeist mit Unrecht *Weidel*sche Reaktion; *Weidel* hat dieselbe für das Hypoxanthin angegeben, das sie aber in Wirklichkeit gar nicht gibt, von *E. Fischer* und *A. Kossel* wurde sie für das Xanthin angegeben. Schon vorher kannte man sie als Reaktion auf das Koffein.

[2]) *E. Fischer* und *U. Suzuki*, Zur Kenntnis des Cystins. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **45**. S. 405 (1905).

[3]) *J. Horbaczewski*, Analyse zweier seltener Harnsteine. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **18**. S. 335 (1894).

# D. Nachweis, Bestimmung und Isolierung von Aceton, Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure.

Von **Gustav Embden** und **Ernst Schmitz** (Frankfurt a. M.).

Aus mehr als einem Grunde ist es gerechtfertigt, den Nachweis, die Isolierung und die Bestimmung der β-Oxybuttersäure, der Acetessigsäure und des Acetons gemeinsam zu behandeln. Stehen doch diese drei Substanzen im engsten genetischen Zusammenhange zueinander.

Die weitaus in erster Linie, vielleicht ausschließlich in Betracht kommende Bildungsart der Ketosäure Acetessigsäure ist die durch Oxydation aus der Alkoholsäure β-Oxybuttersäure.

$$\underset{\beta\text{-Oxybuttersäure}}{CH_3\ CH\ OH\ CH_2\ COOH + O} \quad = \quad \underset{\text{Acetessigsäure.}}{CH_3\ CO\ CH_2\ COOH} + H_2\ O.$$

Das Aceton entsteht, soweit wir bisher wissen, ausschließlich durch Kohlensäureabspaltung aus der Acetessigsäure:

$$\underset{\text{Acetessigsäure}}{CH_3\ CO\ CH_2\ COOH} \quad = \quad \underset{\text{Aceton.}}{CH_3\ CO\ CH_3} + CO_2$$

Der zweite Grund für die gemeinschaftliche Behandlung der drei genannten Körper liegt darin, daß sie vom kranken oder abnorm ernährten Organismus sehr häufig gleichzeitig ausgeschieden werden und demzufolge nebeneinander nachgewiesen und bestimmt werden müssen.

Zudem kann β-Oxybuttersäure leicht im Reagenzglase in Acetessigsäure, diese wiederum in Aceton übergeführt werden, so daß auch die Methoden des Nachweises und der Bestimmung der drei sog. Acetonkörper im engsten Zusammenhange miteinander stehen.

Wollte man Nachweis und Bestimmung dieser Körper in der Reihenfolge besprechen, in der sie im Organismus auftreten, so müßte man mit der β-Oxybuttersäure beginnen und mit dem Aceton schließen.

Aus methodischen Gründen ist es aber zweckmäßiger, den umgekehrten Weg einzuschlagen.

# I. Nachweis, Bestimmung und Isolierung von Aceton.

Vorbemerkungen. Das Aceton ist schon in früher Zeit gelegentlich beobachtet, aber erst von *Liebig*[1]) und *Dumas*[2]) richtig in seiner Zusammensetzung erkannt worden.

In pathologischen Harnen, besonders von Zuckerkranken, entdeckte es *Petters*[3]), *v. Jaksch*[4]) isolierte es zuerst aus normalem Harn.

In der Atemluft ist das Aceton von *Petters* entdeckt worden. Außerdem tritt es im Blut und gelegentlich im Schweiß, im Magendarmkanal und in den Fäzes in geringer Menge auf.

Das Aceton ist eine farblose, leicht bewegliche Flüssigkeit vom Siedepunkt 56·5° und einer Dichte von 0·7973 bei 15°. Es mischt sich in jedem Verhältnis mit Wasser, Äther, Methyläther und Methylalkohol.

Als Dimethylketon gibt es alle Reaktionen der Karbonylgruppe sowie die den Methyl- und Methylenketonen zukommenden Umwandlungen.

Mit Hydrazin, Hydroxylamin, Semicarbazid, Phenylhydrazin und dessen Substitutionsprodukten bildet es das Hydrazon, Oxim, Semicarbazon und die verschiedenen Phenylhydrazone.

$$\begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ C = N\,OH \\ | \\ CH_3 \end{array} \qquad \begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ C = N\,NH\,CO\,NH_2 \\ | \\ CH_3 \end{array} \qquad \begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ C = NNH\,C_6\,H_4\,NO_2 \\ | \\ CH_3 \end{array}$$

Acetoxim — Acetonsemicarbazon — Acetonnitrophenylhydrazon.

Natriumbisulfit addiert sich an die Karbonylgruppe unter Bildung der schön kristallisierenden Verbindung $\begin{array}{l} CH_3 \\ CH_3 \end{array}\!\!>\!C\!<\!\begin{array}{l} OH \\ SO_3\,Na \end{array}$, die mit verdünnter Schwefelsäure oder Alkalikarbonaten das Aceton regeneriert.

Durch Alkalihypochlorit, -hypobromit und -hypojodit wird Aceton zu Essigsäure oxydiert. Die Methylgruppe wird dabei als Chloroform resp. Bromoform oder Jodoform frei:

$$CH_3\,CO\,CH_3 + 3\,Na\,OBr = CBr_3\,H + CH_3\,COO\,Na + 2\,Na\,OH.$$

Zu Polymerisationen neigt das Aceton nicht, was für seinen Nachweis in tierischen Flüssigkeiten nicht unwichtig ist.

Mit Aldehyden kondensiert sich das Aceton zu Verbindungen, von denen das Dibenzalaceton $OC\!\begin{array}{l} \diagup CH = HC\,C_6\,H_5 \\ \diagdown CH = HC\,C_6\,H_5 \end{array}$ und seine Derivate besondere Bedeutung besitzen.

---

[1]) *J. v. Liebig,* Über die Verbindungen, welche durch Einwirkung von Chlor auf Alkohol, Äther, ölbildendes Gas und Essiggeist entstehen. Annalen der Chemie. Bd. 1. S. 225 (1832).

[2]) *Dumas,* Sur l'Esprit pyro-acétique. Annales de Chimie. (2.) T. 49. p. 208.

[3]) *Petters,* Untersuchungen über die Honigharnruhr. Prager Vierteljahrsschrift. Bd. 55. S. 81 (1857).

[4]) *v. Jaksch,* Über Acetonurie. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 6. S. 541 und Über pathologische Acetonurie. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 5. S. 346 (1882).

### 1. Nachweis von Aceton.

Die Methodik des Acetonnachweises ist schon seit Jahrzehnten soweit ausgebildet, daß die sichere Erkennung dieses Stoffes neben allen anderen organischen Verbindungen möglich ist und selbst dann keine unüberwindlichen Schwierigkeiten bietet, wenn er nur in sehr geringer Menge zugegen ist.

Trotzdem sind auch in den letzten Jahren immer wieder neue Acetonproben — größtenteils Farbenreaktionen — angegeben worden. Es ist nicht beabsichtigt, im folgenden eine lückenlose Zusammenstellung aller dieser Vorschläge zu geben[1], vielmehr sind nur diejenigen Reaktionen ausgewählt, die nach dem Grade ihrer Spezifizität für Aceton, ihrer Empfindlichkeit und leichten Ausführbarkeit Anspruch auf praktische Verwendung haben.

Die Reaktionsfähigkeit des Acetons beruht einerseits auf der Gegenwart der Karbonylgruppe, andrerseits auf der durch ihre Nachbarschaft veranlaßten Beweglichkeit der Wasserstoffatome in den beiden Methylgruppen.

Durch Kondensationsreaktionen der Keton- oder Methylgruppen kann man auf einfachem Wege zu wohldefinierten Produkten gelangen, die für die Identifikation des Acetons in tierischen Flüssigkeiten von großer praktischer Bedeutung sind.

Es muß noch hervorgehoben werden, daß fast alle Acetonreaktionen auch mit Acetessigsäure positiv ausfallen. Um Aceton neben Acetessigsäure nachzuweisen, muß man daher zunächst diese beiden Substanzen voneinander trennen, was bei der großen Flüchtigkeit des Acetons leicht durch Vakuumdestillation gelingt (siehe unten die getrennte Bestimmung von Aceton und Acetessigsäure, S. 923).

*a) Legal*sche Probe. Fügt man zu 5 $cm^3$ Harn etwas frisch bereitete ca. 1%ige Nitroprussidnatriumlösung und 2 Tropfen starke Natronlauge, so entsteht eine rubinrote Farbe, die zum Teil durch die Anwesenheit von Kreatinin bedingt ist. Setzt man jetzt Essigsäure im Überschuß zu, so tritt bei Anwesenheit von Aceton eine karmin- bis purpurrote Färbung ein, die nach längerer Zeit durch Violett in Blau übergeht, während die Farbe bei Abwesenheit von Aceton sofort in Gelb umschlägt.

Zu der *Legal*schen Probe sind viele Abänderungsvorschläge gemacht worden.

*Le Nobel*[2]) verwendet statt des fixen Alkalis Ammoniak und beugt so einer Verwechslung mit Aldehyd vor. Die Reaktion tritt indessen bei

---

[1]) Eine solche Zusammenstellung findet sich in der auf umfassendem experimentellen Material fußenden Arbeit von *Bohrisch*, Der Nachweis des Acetons im Harn. Kritische Untersuchungen über die Brauchbarkeit der verschiedenen Methoden. Pharmazeutische Zentralhalle. S. 184, 206, 220, 245 (1907) und Chem. Zentralbl. Bd. **1**. S. 1463 (1907).

[2]) *Le Nobel*, Über den Nachweis des Acetons. Archiv f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **18**. S. 9 (1884).

dieser Arbeitsweise viel langsamer ein. Ihre Anwendung wird in der Praxis nur selten in Betracht kommen.

Auch die Anwendung von Äthylendiamin (*Rimini*[1]) bietet für den Nachweis des Acetons keine besonderen Vorteile.

*b)* Reaktion von *Lieben*. Die Jodoformprobe nach *Lieben* wird zweckmäßig nur am Destillat des Harns oder der sonst zu untersuchenden tierischen Flüssigkeit angestellt. Zu einigen Kubikzentimetern des Destillats derselben setzt man mehrere Tropfen starker Natronlauge und etwas Jod-Jodkalilösung. Nach kurzer Zeit tritt ein schwefelgelber Niederschlag und der charakteristische Geruch des Jodoforms auf. Unter dem Mikroskop zeigt das Jodoform sechsseitige hexagonale Tafeln oder Sterne.

Die Reaktion ist zwar nicht für Aceton völlig charakteristisch, immerhin aber doch sehr wohl anwendbar. Eine Verwechslung mit Alkohol ist, wenn man die Reaktion in der Kälte anstellt, kaum zu befürchten, da dann der Alkohol nur äußerst träge mit der alkalischen Jodlösung reagiert, so daß man selbst bei minutenlangem Zuwarten keine Reaktion auftreten sieht. Wir möchten dies besonders hervorheben, da immer wieder die Angabe in der Literatur auftritt, daß Alkohol beim Nachweis und der Bestimmung des Acetons mittelst alkalischer Jodlösung störend wirke.

Hingegen gibt Aldehyd die Reaktion wie das Aceton auch in der Kälte sehr rasch. Vor einer Verwechslung des Acetons mit Aldehyd kann man sich durch Anwendung der folgenden Probe schützen:

*c) Gunning*sche Probe. Zu 5 $cm^3$ Harndestillat fügt man etwas 10%-iges Ammoniak und entweder nach *Gunning*[2]) etwas alkoholische Jodlösung oder nach *Le Nobel*[3]) Lösung von Jod in Jodammonium, bis der zunächst entstehende schwarze Niederschlag von Jodstickstoff nicht mehr sofort verschwindet. An Stelle des Jodstickstoffs tritt, wenn Aceton vorhanden ist, bald eine weißliche Trübung, die sich unter Abscheidung von kristallisiertem, besonders schön goldgelb gefärbtem Jodoform klärt.

*d)* Reaktion von *Frommer*. Salizylaldehyd kondensiert sich mit Aceton unter dem Einflusse von Alkali zu o,o-Dioxydibenzalaceton,

$$
\begin{array}{llll}
 & & HC = CH & \\
 & CH = HC - C\diagup & & \diagdown CH \\
 & & OHC - CH & \\
OC\diagup & & & \\
\phantom{OC}\diagdown & & HC = CH & \\
 & CH = HC - C\diagup & & \diagdown CH \\
 & & OHC - CH &
\end{array}
$$

einem Körper, dessen Alkalisalze prachtvoll karmoisinrot gefärbt sind.[4])

[1]) *Rimini*, Neue Reaktion des Acetons und neue Methode zur Unterscheidung aliphatischer Amine. Chem. Zentralbl. Bd. 2. S. 133 (1898).

[2]) *Gunning*, Referat. Zeitschr. f. analyt. Chemie. Bd. 24. S. 147 (1862).

[3]) *Le Nobel*, a. a. O.

[4]) *Fabinyi*, Verfahren zur Darstellung eines neuen Seidenfarbstoffs. Chem. Zentralblatt. Bd. 2. S. 302 (1900) und Patentblatt. Bd. 21. S. 764 (1901).

Die Reaktion wird in der Weise angestellt, daß man ca. 1 $cm^3$ 10%iger alkoholischer Salizylaldehydlösung zu 5 $cm^3$ der zu untersuchenden Flüssigkeit fügt, vorsichtig mischt und dann ein ca. 1 *g* schweres Stückchen Stangenkali zufügt, ohne zu schütteln. Bei Gegenwart von Aceton bildet sich an der Berührungsstelle ein karmoisinroter Ring. Sollte die Lösungswärme des Kalis nicht ausreichen, die Reaktion herbeizuführen, so erwärmt man auf 70°. Die Reaktion ist direkt am Harn ausführbar und sehr empfindlich. Normaler Harn gibt nur eine gelbbraune Färbung, Aldehyd reagiert zwar ebenfalls, zeigt aber eine leicht zu unterscheidende braune Farbe. In wässerigen Lösungen ist noch 0·001% Aceton durch die Reaktion nachweisbar. Im Harn geben, wie wir uns überzeugten, 0·01% zugefügten Acetons noch eine stark positive Reaktion.

*c)* Indigoprobe von *Penzoldt.* Orthonitrobenzaldehyd kondensiert sich mit Aceton zum Orthonitrophenylmilchsäureketon.

```
       CNO2    H                                  CNO2     H
      //       |                                 \\        |
HC          C ——C + CH2 CO CH3    =    HC          C———C — CH2 CO CH3
 |          ||  ‖    |                  ||         |    |
HC          CH  O    H                 HC          CH   OH
   \\      /                               \     //
      CH                                      CH
o-Nitrobenzaldehyd       Aceton          o-Nitrophenylmilchsäureketon.
```

Bei Einwirkung von Alkalien geht das Keton unter Abspaltung von Wasser und Essigsäure in Indigo über.

```
2 C6 H4 < NO2
          CH OH CH2 CO CH3     =
                CH                            CH
             //                                  \\
          HC       C———CO       OC———C           CH + 2 H2 O
   =       |       ||    |           |    |       |
          HC       C     C=====C      C           CH + 2 CH3 COOH
             \\      \  /   Indigo  \  /       //
                CH    N              N        CH
                      |              |
                      H              H
```

Auf diese von *Baeyer* und *Drewsen* [1]) gefundene Synthese hat *Penzoldt* [2]) einen qualitativen Acetonnachweis gegründet.

Einige Kristalle des Orthonitrobenzaldehyds werden in der zu prüfenden Flüssigkeit bei einer 50° nicht übersteigenden Temperatur gelöst und nach dem Erkalten etwas Natronlauge zugesetzt. Die Flüssigkeit färbt sich zunächst gelb, bei Anwesenheit größerer Acetonmengen bald grün. Chloroform nimmt beim Schütteln mit dem Gemenge eine blaue Farbe an, die bei einer wässerigen Lösung noch bei 0·05%, im Harn bei

[1]) *Baeyer* und *Drewsen*, Darstellung von Indigblau aus Orthonitrobenzaldehyd. Ber. d. Deutsch chem. Ges. Bd. **15**. S. 2860 (1882).

[2]) *Penzoldt*, Beiträge zur Lehre von der Acetonurie und von verwandten Erscheinungen. Archiv f. klin. Med. Bd. **34**. S. 132 (1884).

0·1% Aceton deutlich erkennbar ist. Die *Penzoldt*sche Probe tritt auch mit Acetaldehyd ein.

*f)* Reaktion von *Reynolds*. Aceton vermag frischgefälltes Quecksilberoxyd in Lösung zu bringen. Diese von *Reynolds* beobachtete Erscheinung benutzte *Gunning* zu einem Acetonnachweis, den man am besten folgendermaßen anstellt: Einige Tropfen 5%iger Sublimatlösung werden mit überschüssiger verdünnter Alkalilauge, etwas Alkohol und mit der zu prüfenden Flüssigkeit versetzt und heftig geschüttelt. Man filtriert hierauf so oft durch ein doppeltes Filter, bis das Filtrat absolut klar ist, säuert mit Salzsäure an und überschichtet mit Schwefelammoniumlösung. Ein brauner Ring zeigt den positiven Ausfall der Reaktion an. Die Probe kann nur in wässerigen Lösungen angestellt werden, gilt aber hier als sehr empfindlich. (Nach *Le Nobel* ist 0·01 *mg* Aceton in 1 $cm^3$ Wasser nachweisbar.) Acetessigsäure reagiert ebenso wie Aceton. Über das Verhalten des Aldehyds widersprechen sich die Angaben. Nach unseren Versuchen gibt Acetaldehyd bei irgend stärkeren Verdünnungen die Reaktion nicht.

Ein Übelstand bei der Ausführung dieser Reaktion ist es, daß auch bei sehr häufigem Filtrieren oft Quecksilberoxyd durch das Filter geht.

*g)* Reaktion von *Stock-Fröhner*. Chemisch besonders interessant und nach den Autoren sehr empfindlich ist die Hydroxylaminreaktion von *Stock-Fröhner*.[1])

Nach *Stock* werden einige Kubikzentimeter Harndestillat mit einem Tropfen 10%iger Hydroxylaminchlorhydratlösung, 1—2 Tropfen Normalnatronlauge und 2 Tropfen Pyridin versetzt. Man überschichtet mit 1 $cm^3$ Äther, gibt Bromwasser bis zur Gelbfärbung des Äthers und etwas Wasserstoffsuperoxyd zu und schüttelt. Der Äther färbt sich bei Anwesenheit von Aceton blau. Empfindlichkeitsgrenze 1 *mg* in 5 $cm^3$ Destillat. Der Verlauf der Reaktion ist folgender:

Aceton bildet mit Hydroxylamin Acetoxim. Dieses wird durch das Brom substituiert und das so entstandene Produkt durch Pyridin zu tiefblauem Bromnitrosopropan umgelagert:

$$\underset{\text{Acetoxim}}{\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!\!>C = NOH} + Br_2 = \underset{\text{Acetoximbromid}}{\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!\!>C = NOBr} + HBr$$

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!\!>C = NOBr \xrightarrow{\text{Pyridin}} \underset{\text{Bromnitrosopropan}}{\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!\!>C\!\!<\begin{matrix}Br\\NO\end{matrix}}$$

Das Wasserstoffsuperoxyd beseitigt störende Verunreinigungen.

*Fröhner* hat die Zahl der nötigen Operationen durch folgendes Verfahren sehr eingeschränkt:

In 5 $cm^3$ Harndestillat wird ein Kristall Hydroxylaminchlorhydrat gelöst, Chlorkalklösung zugetropft und mit Äther ausgeschüttelt, der bei

[1]) *Blumenthal* und *Neuberg*, Über Entstehung von Aceton aus Eiweiß. Deutsche med. Wochenschr. Bd. 6 (1901). — *Fröhner*, Zur *Stock*schen Acetonreaktion. Ebenda. Bd. 27. S. 79 (1901).

Gegenwart von Aceton die blaue Farbe zeigt. Bei dieser Form der Reaktion entsteht ein Chlorderivat des Nitrosopropans. Aldehyd reagiert positiv.

Als zweckmäßigstes Verfahren zur Auffindung des Acetons möchten wir empfehlen, die vorliegende Flüssigkeit mit der *Legal*schen oder *Frommer*schen Probe zu prüfen. Der positive Ausfall dieser Reaktionen weist auf das Vorhandensein von Aceton oder von Acetessigsäure hin.

Will man entscheiden, welche von diesen beiden Substanzen vorliegt, so ist es zweckmäßig, die Flüssigkeit im Vakuum bei einer 34—35° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers zu destillieren, wobei das Aceton mit dem Wasserdampf sehr rasch übergeht, während die Acetessigsäure zurückbleibt. Es muß durch sehr starke Kühlung dafür Sorge getragen werden, daß das Aceton nicht aus der Vorlage verdampft, eventuell kann man auch das Acetonreagens direkt in die Vorlage einbringen. Destilliert man die Flüssigkeit unter gewöhnlichem Druck bei saurer Reaktion, so tritt nicht nur das präformierte Aceton ins Destillat über, sondern auch das durch Spaltung von Acetessigsäure gebildete.

Für den endgültigen Nachweis des Acetons ist es notwendig, es in Form einer charakteristischen Verbindung zu isolieren.

## 2. Quantitative Bestimmung des Acetons.

Die für die Bestimmung des Acetons im Harn und in Organen übliche Methode von *Messinger-Huppert* bestimmt nicht nur das präformierte, sondern auch das erst durch Zersetzung der Acetessigsäure beim Erhitzen auf 100° entstehende Aceton.

Will man das präformierte Aceton und die Acetessigsäure für sich bestimmen, so muß man das Verfahren von *Embden* und *Schliep* oder das von *Folin* anwenden. Diese Methoden sollen erst weiter unten bei der quantitativen Bestimmung der Acetessigsäure geschildert werden (S. 923).

An dieser Stelle besprechen wir zunächst nur die Bestimmung des gesamten, durch Destillation des Harns oder Organextraktes bei 100° gewinnbaren Acetons, also die Bestimmung der Summe des präformierten Acetons und desjenigen aus Acetessigsäure. Wir bezeichnen diese Summe nach dem Vorgange von *Embden* und *Schliep* als Gesamtaceton.

### Bestimmung des Gesamtacetons nach *Messinger-Huppert.*

Prinzip der Methode: Das Prinzip dieser Bestimmung besteht darin, daß, wie bereits oben ausgeführt worden ist, Aceton mit alkalischer Jodlösung unter Bildung von Jodoform und Essigsäure reagiert.

I. $2\,NaOH + 2\,J = NaOJ + NaJ + H_2O$

II. $CH_3COCH_3 + 3\,NaOJ = CJ_3H + CH_3COONa + 2\,NaOH.$

Es verbraucht also ein Molekül Aceton bei der Jodoformbildung drei Moleküle Hypojodit. Eine alkalische Jodlösung enthält von vornherein gleich viel Moleküle Jodalkali und unterjodigsaures Alkali. Beim Ansäuern

wird jeweils ein Molekül Jodalkali durch ein Molekül unterjodigsaures Alkali zu Jod oxydiert. Diese Oxydation bleibt natürlich aus, wenn das Hypojodit zur Jodoformbildung verbraucht worden ist. Es wird also eine der verbrauchten Menge Hypojodit äquivalente Jodalkalimenge nicht zu Jod regeneriert, so daß im ganzen auf jedes Molekül Aceton 6 Atome Jod verbraucht werden.

*a)* Ausführung der Bestimmung des Gesamtacetons am Harn.

In den Destillationskolben — etwa einen Erlenmeyerkolben von $^3/_4$ *l* — mißt man den zu untersuchenden Harn, bei reichlichem Acetongehalt 20 *cm*³, bei geringem Gehalt entsprechend mehr. Der Harn wird mit 150 *cm*³ Wasser und 2 *cm*³ 50%iger Essigsäure versetzt.

Als Vorlage benutzt man bei der Destillation einen Erlenmeyerkolben von 500 *cm*³, der mit 150 *cm*³ möglichst kalten Wassers beschickt ist.

Unter ausgiebiger Kühlung wird die Flüssigkeit destilliert und während 25 Minuten im Sieden erhalten, wobei etwa 60 *cm*³ Flüssigkeit übergehen sollen.

Nach dem Unterbrechen der Destillation unter Spülung des Destillationsrohres wird direkt die Titration vorgenommen.

Zu diesem Zwecke werden in die Vorlage 30 *cm*³ 33%ige Natronlauge und aus einer Bürette ein reichlicher Überschuß von Zehntelnormaljodlösung unter leichtem Umschwenken gegeben. Man erkennt das Vorhandensein eines Überschusses an Jod daran, daß beim Einfallen eines Tropfens Salzsäure an der Berührungsstelle eine braune Färbung auftritt.

Das Jodoform fällt zunächst als weißgelbe Trübung aus, die sich bald in intensiv gelb gefärbte Kristalle umwandelt.

Nach 5 Minuten säuert man mit Salzsäure von 25% an, gibt einige Tropfen Stärkelösung zu und titriert mit Zehntel-Normalthiosulfatlösung das unverbrauchte Jod zurück.

1 *cm*³ Zehntelnormaljodlösung entspricht 0·967 *mg* Aceton.

Die im vorstehenden geschilderte Ausführungsart der Acetonbestimmung nach *Messinger-Huppert* stellt in verschiedenen Punkten eine Vereinfachung des meist üblichen Verfahrens dar.

Zunächst destillieren wir nicht, wie man das nach *Hupperts* Vorschrift tun soll, das bei essigsaurer Reaktion gewonnene Destillat nochmals bei salzsaurer Reaktion, sondern titrieren direkt das erste Destillat.

Die zweite Destillation ist nach *Huppert* notwendig, weil aus dem nur mit Essigsäure angesäuerten Harn mit dem Aceton Ammoniak übergeht, das durch Bildung von Jodstickstoff natürlich Jod dem Nachweise entziehen muß, wodurch dann die Acetonwerte zu hoch erscheinen. Bei der von uns geübten Art der Destillation geht nun aber Ammoniak nicht oder doch nicht in irgend in Betracht kommenden Mengen über, vielmehr tritt das Übergehen von Ammoniak in das Destillat erst dann ein, wenn die destillierende Flüssigkeit sehr weit eingeengt ist, viel weiter, als es bei

unserer oben beschriebenen Art der Destillation jemals der Fall ist. Wir haben uns hiervon an der Hand der *Nessler*schen Reaktion überzeugt.

Die Befürchtung, daß bei der relativ kurzdauernden Destillation nicht alles Aceton in das Destillat übertritt, ist, wie wir in Versuchen mit Zusatz zum Teil sehr erheblicher, bekannter Mengen Aceton nachweisen konnten, unbegründet.

Wir fanden nämlich zugesetztes Aceton zu 100% wieder. Die geringen Verluste, die andere Autoren — z. B. *Schwarz*[1]), der nur 96 bis 97% erhielt — bei der Ausführung der *Messinger*schen Methode nach der *Huppert*schen Vorschrift hatten, dürften wohl auf die zahlreicheren Manipulationen, die nach dieser Vorschrift nötig sind, zurückzuführen sein.

Das starke Einengen des Harns ist nicht nur wegen des dabei eintretenden Überganges von Ammoniak ins Destillat zu unterlassen, es können dabei auch andere Produkte ins Destillat übergehen, die Jod binden. Insbesondere können bei starkem Einengen aus etwa vorhandenem Traubenzucker, wie neuerlich *Borchardt*[2]) hervorgehoben hat, flüchtige, jodbindende Substanzen entstehen.

Wir verwenden, wie oben angegeben, für das Auffangen des Destillats einfach einen Erlenmeyerkolben mit 150 $cm^3$ stark gekühlten Wassers. Diese Vorlage genügt, wenn nur während der Destillation auch das Destillationsrohr ausreichend gekühlt wird, vollkommen, um Acetonverluste zu vermeiden. Alle komplizierteren Vorrichtungen zum Auffangen des Destillats bei Acetonbestimmungen sind bei genügend vorsichtigem Arbeiten unnötig.

Es ist von *Huppert* empfohlen worden, das Destillat nach dem Zusatze von Alkali und Jod in einer Flasche mit eingeriebenem Stöpsel zu schütteln. Bei der Verwendung eines offenen Erlenmeyerkolbens zur Titration unterläßt man stärkeres Schütteln besser, mischt vielmehr das Destillat mit der Natronlauge nur durch leichtes Schwenken, um Acetonverluste zu vermeiden.

Selbstverständlich muß der Titer der Zehntelnormaljodlösung und Thiosulfatlösung sehr oft kontrolliert werden, wenn er auch nach unseren Erfahrungen beim Aufbewahren dieser Flüssigkeiten im Kühlen und Dunkeln sehr lange unverändert bleibt.

Die verwandte Natronlauge muß nitritfrei sein und vor dem Versuch auf ihr Verhalten gegen Jod geprüft werden, von dem die Handelsware nach unseren Erfahrungen manchmal kleine Mengen bindet.

Vielfach ist die Anschauung verbreitet, daß durch einen Gehalt des Harns an Äthylalkohol, der natürlich in das Destillat mit übergeht, das Resultat der Acetonbestimmung unrichtig, und zwar zu hoch wird. Unter den oben angegebenen Versuchsbedingungen ist aber die Anwesenheit von Äthylalkohol selbst in recht erheblichen Mengen ohne jeden Einfluß auf die

---

[1]) *Leo Schwarz*, Über die Oxydation des Acetons und homologer Ketone der Fettsäurereihe. Archiv f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **40**. S. 168 (1898).

[2]) *L. Borchardt*, Über Fehlerquellen bei der Bestimmung des Acetons. *Hofmeisters* Beitr. Bd. 8. S. 62 (1906).

gebundene Jodmenge, da er in der Kälte nur äußerst träge mit der alkalischen Jodlösung reagiert.

Eine praktisch allerdings wohl kaum in Betracht kommende Beimengung von Acetaldehyd zum Destillat würde dagegen die Resultate der Acetonbestimmung beeinträchtigen, da Acetaldehyd mit alkalischer Jodlösung recht rasch unter Jodoformbildung reagiert. Man kann nach dem Vorgange *Shaffers*[1]) den Acetaldehyd durch nochmalige Destillation unter Zusatz von etwas Natronlauge und 20 *cm*³ der offizinellen Wasserstoffsuperoxydlösung leicht unter Oxydation beseitigen.

### *b)* Bestimmung des Gesamtacetons im Blut und in Organen.

Die Bestimmung des Gesamtacetons im Blut und in Organen kann einfach in der Weise erfolgen, daß man eine bestimmte Menge des möglichst frisch[2]) zu untersuchenden Blutes resp. des Organbreies mit dem 4—5fachen Volumen Wasser vermischt, mit Essigsäure ansäuert und unter ausreichender Kühlung direkt destilliert, jedoch kommt es hierbei sehr leicht zu starkem Stoßen und Schäumen.

Ist in das Destillat etwas von der Flüssigkeit übergegangen, so muß es selbstverständlich nochmals der Destillation unterworfen werden.

Weit bequemer ist es, das Blut resp. den fein zerhackten Organbrei nach der Methode von *Schenck* mit Salzsäure und Sublimat zu fällen und die Bestimmung des Gesamtacetons mit dem Filtrat dieser Fällung vorzunehmen. Im einzelnen gestaltet sich die Ausführung folgendermaßen:

Eine nicht zu geringe Menge des zu untersuchenden Materials (möglichst mindestens 150 *cm*³ Blut resp. 150 *g* Organbrei) wird mit der gleichen Menge Wasser und je der doppelten Menge Salzsäure von 2% HCl und Quecksilberchloridlösung von 5% versetzt und gut durchgerührt. Sobald sich der Eiweißniederschlag abgesetzt hat, kann man durch ein großes Faltenfilter filtrieren. Die Resultate werden so nicht weniger richtig, als wenn man die Flüssigkeit über Nacht stehen läßt.

Für die Bestimmung des Gesamtacetons verwenden wir gewöhnlich je 500 *cm*³ Filtrat. Die Bestimmung wird stets doppelt ausgeführt.

Es genügt bei Verwendung dieser Flüssigkeitsmenge völlig, die Flüssigkeit während 20—25 Minuten im Sieden zu erhalten, wobei etwa 60 *cm*³ Flüssigkeit übergehen.

Die titrimetrische Bestimmung im Destillat erfolgt ganz in der oben für den Harn beschriebenen Weise.

### *c)* Bestimmung des Acetons in der Atemluft.

Wir haben bereits hervorgehoben, daß im Organismus auftretendes Aceton, soweit es nicht verbrannt wird, nur zum kleinsten Teil mit dem

[1]) *Ph. Shaffer*, A method for the quantitativ Determination of β-Oxybutyric Acid in Urine. The Journ. of biol. chem. Vol. 5. p. 220 (1908/09).

[2]) Es ist nötig, die Untersuchung an möglichst frischen Organen anzustellen, weil überlebende Organe Aceton und Acetessigsäure nach *Embden* und *Michaud* (*Hofmeisters* Beitr. Bd. 11. S. 332 [1908]) sehr rasch zerstören können.

Harn, zum weitaus größten Teil mit der Atemluft ausgeschieden wird. Ähnlich verhält sich auch in den Organismus künstlich eingeführtes Aceton. Es erwuchs daher die Aufgabe, das Aceton in der Atemluft zu bestimmen. Die nicht mit Wasserdämpfen flüchtige Acetessigsäure geht natürlich nicht in die Atemluft über.

α) Verfahren von *Geelmuyden.*[1]) *Geelmuyden* bestimmte an Tieren das Aceton der Atemluft unter Anwendung eines dem *Pettenkofer*schen ähnlichen Respirationsapparates. Diese Methode soll hier nur im Prinzip kurz skizziert werden.

Durch einen Kasten, in dem sich der Käfig für das Versuchstier befindet, wurde ein Luftstrom durchgeleitet. Die Ableitung verzweigte sich in zwei Teile. Die Hauptmenge der austretenden Luft wurde durch Kalilauge und Natronkalk von Kohlensäure befreit und mittelst einer Gasuhr gemessen. Die die Nebenleitung passierende Luft, die ebenfalls durch eine Gasuhr gemessen wurde, diente zur Bestimmung des Acetons. Sie wurde zunächst durch ein Absorptionsgefäß mit Kalilauge, dann durch ein Verbrennungsrohr mit glühendem Kupferoxyd und endlich durch ein Absorptionsrohr mit titriertem Barytwasser geleitet.

In dem Absorptionsgefäß mit Kalilauge wurde Kohlensäure und ein Teil des in der Atemluft enthaltenen Acetondampfes zurückgehalten. Der Rest verbrannte in der Kupferoxydröhre zu Wasser und Kohlensäure, welch letztere in der Barytröhre absorbiert, in der gewöhnlichen Weise titrimetrisch bestimmt und in Aceton umgerechnet wurde.

Das in der Kaliröhre befindliche Aceton wurde nach der *Messinger*schen Methode titrimetrisch bestimmt. Durch Umrechnung auf das gesamte, den Apparat passierende Luftquantum wurde die gesamte, von dem Versuchstier mit der Atemluft ausgeschiedene Acetonmenge bestimmt.

β) Verfahren von *Fr. Voit.*[2]) Auch *Voit* bediente sich bei seinen quantitativen Bestimmungen des Acetons in der Atemluft des *Pettenkofer-Voit*schen Respirationsapparates.

Er ließ einen gemessenen Luftstrom durch vier hintereinander geschaltete, mit dauernd gekühltem Wasser beschickte *Woulf*sche Flaschen streichen. Das Aceton wurde in den ersten beiden Flaschen absorbiert.

γ) Verfahren von *L. Schwarz. Schwarz*[3]) brachte bei seinen Bestimmungen des Acetons in der Atemluft das Versuchstier unter eine hermetisch abgeschlossene Glasglocke, durch welche mittelst einer Wasserstrahlpumpe ein regulierbarer Luftstrom durchgesaugt wurde.

Die angesaugte Luft strich durch eine Waschflasche mit destilliertem Wasser. Der Exspirationsstrom hatte ein System solcher Flaschen zu pas-

---

[1]) *H. Chr. Geelmuyden,* Über Aceton als Stoffwechselprodukt. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **23**. S. 436 (1897).

[2]) *Fr. Voit,* Beitrag zur Lehre von der Acetonausscheidung. Arch. f. klin. Med. Bd. **66** (1899).

[3]) *Leo Schwarz,* Über die Oxydation des Acetons und homologe Ketone der Fettsäurereihe. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **40**. S. 172 (1898).

sieren, die je nach der Menge des zu erwartenden Acetons mit wechselnden Quanten destillierten Wassers gefüllt waren und während des Versuches ausgewechselt werden konnten. Zum Zurückhalten des Acetons diente außer den Wassermengen in diesen Flaschen noch eine Quantität destillierten Wassers, die in den Glockenraum selbst gebracht wurden.

δ) Verfahren von *Johannes Müller.* Am Menschen hat zuerst *Johannes Müller*[1]) Acetonbestimmungen in der Atemluft ausgeführt. Die Trennung der In- und Exspirationsluft wird durch eine dem *Geppert-Zuntz*schen Apparat entlehnte Ventilanordnung besorgt. Die Exspirationsluft streicht durch vier hintereinander geschaltete *Woulf*sche Flaschen von 0·5 *l* Inhalt, die zur Hälfte mit destilliertem Wasser gefüllt sind, das durch eine Kältemischung stark gekühlt wird. Zwischen die *Woulf*schen Flaschen und das Exspirationsventil ist ein ca. 3 *l* fassender Gummisack als Windkessel eingeschaltet, der den Zweck hat, den Exspirationsstrom aus einem ungleichförmigen in einen gleichförmigen umzuwandeln.

Die vier hintereinander geschalteten, wassergefüllten Waschflaschen stellen natürlich für den Exspirationsstrom ein sehr wesentliches Hindernis dar. Dieses Hindernis wird durch einen *Geigl-Mayr*schen Schöpfradventilator überwunden; durch schnelleres oder langsameres Drehen des Schöpfrades und durch Öffnen von Nebenhähnen kann die Aspirationskraft beliebig reguliert werden, so daß stets die Exhalationsluft ohne Widerstand das Ausatmungsventil, den Gummisack und das Wasser in den vier *Woulf*schen Flaschen passiert.

Bei der Ausführung des Versuches wird als Mundstück das bekannte des *Zuntz-Geppert*schen Apparates verwendet. Die Nase wird natürlich zugeklemmt. Die Versuche können ohne Beschwerden für die Versuchsperson eine Stunde und länger fortgesetzt werden, doch erwies es sich als zweckmäßig, sie nicht über 20—30 Minuten auszudehnen, weil sonst die Absorption des Acetons unvollständig werden kann.

Die Absorption des Acetons in dem Wasser der Waschflaschen ist dann als vollständig anzusehen, wenn in der letzten Flasche mittelst der *Lieben*schen Jodoformreaktion Aceton nicht oder nur in Spuren nachweisbar ist.

Nach dem Schluß des Versuches wird der Inhalt der *Woulf*schen Flaschen vereinigt und in der gesamten Wassermenge oder einem gemessenen aliquoten Teil derselben das Aceton direkt nach *Messinger-Huppert* titriert.

Eine anscheinend nicht unzweckmäßige Modifikation des *Müller*schen Verfahrens hat *Waldvogel*[2]) vorgeschlagen.

---

[1]) *Johannes Müller*, Über die Ausscheidungsstätten des Acetons in der Atemluft und den Hautausdünstungen des Menschen. Archiv f. experim. Path. u. Pharm. Bd. 40. S. 351 (1898).

[2]) *Waldvogel,* Die Acetonkörper. Stuttgart 1903. S. 25.

Anhang.

Auf die Eigenschaft des Acetons, mit Quecksilbersulfat sehr schwer lösliche Verbindungen zu geben, hat *Denigès* eine quantitative Methode zu gründen versucht. In ihrer gravimetrischen[1]) Form ist dieselbe zum mindesten umständlicher als die Titration, während die sogenannte chronometrische[2]) von allzuviel Zufälligkeiten abhängen dürfte.

Gegen beide Anwendungsformen spricht die Tatsache, daß die Zusammensetzung der Niederschläge nicht endgültig feststeht und nicht einmal bewiesen ist, daß immer dieselbe Verbindung entsteht.

Über die quantitative Bestimmung des Acetons als p-Nitrophenylhydrazon siehe unten unter Isolierung des Acetons S. 919.

## 3. Isolierung des Acetons.

### *a)* Isolierung des Acetons in Substanz.

*Deichmüller*[3]) hat auf folgende Weise größere Mengen reinen Acetons aus Harn dargestellt.[4]) Je 2 *l* Harn wurden auf kleiner Flamme möglichst rasch destilliert, bis ungefähr der zehnte Teil übergegangen war. Von diesem Destillat wurden allmählich 4 *l* gesammelt. Es reagierte stark ammoniakalisch und war durch übergeschäumte Karbonate getrübt. Durch mehrmalige Destillation wurde die Flüssigkeit an Aceton angereichert. Beendet wurde die Operation jedesmal dann, wenn das Destillat keine *Lieben*sche Reaktion mehr gab.

Endlich wurde das Destillat mit Pottasche gesättigt, die ölige Schicht abgehoben, zur Entfernung von Alkohol mit frisch getrocknetem porösen Chlorcalcium behandelt und nach einigen Tagen abdestilliert. Durch fraktionierte Destillation wurde hierbei Aceton vom richtigen Siedepunkt gewonnen. Zur weiteren Reinigung kann man das Aceton in die Bisulfitverbindung überführen.

### *b)* Isolierung des Acetons in Form kristallisierender Verbindungen.

Für die Isolierung des Acetons in Substanz sind außerordentlich große Mengen acetonhaltigen Harnes erforderlich. Weit leichter kann man das Aceton in Form einer seiner charakteristischen kristallisierenden Verbindungen isolieren.

---

[1]) *Denigès*, Nachweis und Bestimmung des Acetons mit Merkurisulfat. Chem. Zentralbl. Bd. **1**. S. 233 (1909).

[2]) L'application de la méthode chronométrique à l'analyse quantitative. Annales de Chimie. [8.] T. **12**. p. 394 (1908).

[3]) *Deichmüller*, Über diabetische Acetonurie. *Liebigs* Annalen d. Chem. Bd. **209**. S. 22 (1881).

[4]) Dieses Aceton dürfte zum größten Teil erst bei der Verarbeitung des Harn aus Acetessigsäure entstanden sein.

α) Isolierung des Acetons als p-Nitrophenylhydrazon.[1])

Das Aceton reagiert mit p-Nitrophenylhydrazin unter Bildung von Aceton-p-nitrophenylhydrazon, einer fast wasserunlöslichen, prachtvoll kristallisierenden Substanz:

$$\frac{CH_3}{CH_3} > CO + H_2\,NNHC_6\,H_4\,NO_2 = \frac{CH_3}{CH_3} > C = NNHC_6\,H_4\,NO_2 + H_2\,O$$

p-Nitrophenylhydrazin — Aceton-p-nitrophenylhydrazon.

200 *cm*³ Harn werden nach Zusatz von 5 *cm*³ 33%iger Schwefelsäure destilliert und das Destillat in stark gekühlter Vorlage aufgefangen. Man destilliert 100—120 *cm*³ ab und versetzt mit einer nötigenfalls filtrierten frischen Lösung von 0·5—1 *g* des Paranitrophenylhydrazins in 5 *cm*³ Eisessig und 10 *cm*³ Wasser. Es entsteht sofort eine Trübung und schon nach einer Minute scheidet sich ein reingelber kristallinischer Niederschlag aus. Zur völligen Abscheidung genügt eine halbe Stunde. Längeres Stehenlassen ist wegen möglicher Zersetzung des Reagens zu vermeiden.

Der Niederschlag wird auf einem gewogenen, gehärteten Filter abgesaugt und unterhalb von 80° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Acetonparanitrophenylhydrazon kristallisiert aus wenig heißem Alkohol in langen glänzenden goldgelben Nadeln. Schmelzpunkt 148—148·5°.[2])

Die gefundene Hydrazonmenge mit 0·3 multipliziert ergibt die Menge des Acetons. Für 100 *cm*³ der gefällten Lösung addiert man zur Korrektur des Löslichkeitsfehlers 0·006 *g* Hydrazon oder 0·0018 *g* Aceton. In dieser Form soll die Isolierung des Acetons als p-Nitrophenylhydrazon auch als quantitative Bestimmungsmethode anwendbar sein.

β) Isolierung des Acetons als Dibenzalaceton.

Aceton bildet in alkalischer Lösung mit Benzaldehyd durch Kondensation das schön kristallisierende Dibenzalaceton.[3])

$$OC < \frac{CH_3}{CH_3} + \frac{OCHC_6\,H_5}{OCHC_6\,H_5} = OC < \frac{CH = CHC_6\,H_5}{CH = CHC_6\,H_5} + 2\,H_2\,O$$

Aceton — Benzaldehyd — Dibenzalaceton.

Die acetonhaltige Flüssigkeit wird in der eben geschilderten Weise destilliert, bis kein Aceton mehr übergeht und das Destillat noch einmal in gleicher Weise behandelt. Bei nochmaliger Destillation fängt man die übergehende Flüssigkeit in Reagenzgläsern auf, gibt in jedes 2 *cm*³ Natron-

[1]) *van Ekenstein* und *Blanksma*, Sur quelques hydrazones dérivés des nitrophénylhydracines ortho, meta et para. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas. T. **24**. p. 33 (1905). — *S. Möller*, Über Acetonbestimmung im Harn. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **64**. S. 207 (1907).

[2]) *Bamberger* und *Sternitzki*, Weiteres über Dihydromethylketol. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **26**. S. 1306 (1893).

[3]) *Vorländer* und *Hobohm*, Über die Kondensation von Ketopentamethylen mit Aldehyden. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **29**. S. 1840 (1896). — *Embden* und *Kalberlah*, Über Acetonbildung in der Leber. I. Mitteilung. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **8**. S. 3 (1906).

lauge von 10% und 2 Tropfen Benzaldehyd, schüttelt zur Lösung des Aldehyds und läßt gut verschlossen bei Zimmertemperatur stehen. Nach Verlauf von 24 Stunden ist meistens die anfangs entstandene ölige Trübung in einen schön kristallinischen Niederschlag übergegangen, der auf einem gehärteten Filter abgesaugt und mit Wasser bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion gewaschen wird. Das Waschwasser geht anfangs trübe durch, ohne daß jedoch merkliche Materialverluste entstehen. Man löst in wenig heißem Alkohol und spritzt auf dem Wasserbade heißes Wasser bis zur beginnenden Trübung zu. Bei langsamem Abkühlen scheidet sich die Hauptmenge des Produktes kristallinisch aus. Meistens schon jetzt, immer aber nach nochmaligem Umlösen zeigt die Substanz den Schmelzpunkt 112° (korr.).

## II. Nachweis und Bestimmung der Acetessigsäure.

Die Acetessigsäure ist ein in freiem Zustande und in konzentrierteren Lösungen ihrer Salze so unbeständiger Körper, daß ihre Darstellung erst gelang, als sie in Form ihrer Ester schon lange bekannt war. 1863 stellte *Geuther* [1]) zuerst den Acetessigsäureäthylester durch Einwirkung von Natrium auf essigsaures Äthyl dar. Er fand auch, daß der Ester mit Eisenchlorid eine kirschrote Färbung gibt.

Als im Jahre 1865 dann *Gerhardt* [2]) entdeckte, daß Diabetikerharne mit Eisenchlorid sich rot färben, glaubte er diese Erscheinung auf einen Gehalt an acetessigsaurem Äthyl zurückführen zu müssen.

Diese Ansicht schien dadurch eine Stütze gewinnen zu sollen, daß mehrere Autoren, z. B. *Hilger* [3]), angaben, aus diabetischem Harn die zu erwartenden Spaltprodukte des Acetessigsäureäthylesters, nämlich Aceton und Äthylalkohol, dargestellt zu haben.

Demgegenüber stellten *Deichmüller* [4]) und *Tollens* [5]) fest, daß bei Destillation diabetischer, die Eisenchloridreaktion gebender Harne zwar Aceton in reichlicher Menge, Alkohol aber höchstens in Spuren isoliert werden kann, daß ferner die mit Eisenchlorid reagierende Substanz eine stärkere Säure als Essigsäure ist und somit nicht der nur wenig saure Ester sein kann. Sie sprachen die Vermutung aus, daß die freie Acetessigsäure vorliege.

Kurz nachher gelang *Ceresole* [6]) die Darstellung der freien Acetessigsäure durch Verseifung des Esters mit Kalilauge von $2^1/_2$% in der Kälte

[1]) *Geuther,* Jahresbericht über die Fortschritte der Chemie. S. 323 (1863).

[2]) *Gerhardt,* Über Diabetes melitus und Aceton. Wiener med. Presse. Bd. **6**. S. 28 (1865).

[3]) *Hilger,* Über den Nachweis der sogenannten Äthyldiacetsäure im Harn. Annalen der Chem. Bd. **195**. S. 314 (1879).

[4]) *Deichmüller,* a. a. O.

[5]) *Tollens,* Über Eisenchlorid rotfärbenden Harn. Annalen der Chem. Bd. **209**. S. 30 (1881).

[6]) *Ceresole,* Über Nitrosoaceton und Acetessigsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **15**. S. 1326 (1882); Über Acetessigsäure. Ebenda. S. 1872.

und die von ihm beobachteten Eigenschaften decken sich soweit mit denen der im Diabetikerharn vorkommenden Säure, daß die Vermutung von *Tollens* zur Gewißheit wurde.

Die freie Acetessigsäure wird am besten durch Zersetzung des Bariumsalzes mit Schwefelsäure, Ausäthern und vorsichtiges Verjagen des Äthers dargestellt.

Sie bildet eine farblose, dickliche, hygroskopische, mit Wasser in jedem Verhältnis mischbare, sehr saure Flüssigkeit, die sich schon unterhalb 100° stürmisch in Aceton und Kohlensäure zersetzt.

Mit Eisenchlorid färben sich sowohl die freie Säure als auch ihre Salze rotviolett.

Das Barytsalz, Silbersalz, Kupfersalz und Zinksalz sind leicht wasserlöslich und amorph.

### 1. Nachweis der Acetessigsäure.

Zum Nachweis der Acetessigsäure muß wegen der eben erwähnten großen Zersetzlichkeit dieses Körpers möglichst frischer Harn verwendet werden.

*a)* Reaktion von *Gerhardt*. Die Eisenchloridreaktion, durch die, wie eben erwähnt, *Gerhardt* auf das Vorhandensein der Acetessigsäure im Harn aufmerksam wurde, wird auch heute noch allgemein angewendet.

Ihre Ausführung geschieht in der Weise, daß man dem zu prüfenden Harn 10%ige Eisenchloridlösung tropfenweise zusetzt, bis die anfangs entstehende Fällung von Eisenphosphat sich wieder gelöst hat. Bei Gegenwart von Acetessigsäure zeigt der Harn dann eine rotviolette Färbung von großer Intensität.

Eine Rotfärbung mit Eisenchlorid erhält man nun aber auch mit Ameisensäure, Essigsäure und Rhodanwasserstoffsäure, ferner mit Phenolen und Phenolkarbonsäuren. In allen diesen Fällen tritt die Färbung aber auch nach kurzem Aufkochen des Harns auf, während sie nicht mehr eintritt, wenn sie durch Acetessigsäure verursacht war.

Um die Acetessigsäure neben den genannten Säuren nachzuweisen, prüft man den ätherischen Auszug des angesäuerten Harns mit einer dünnen wässerigen Eisenchloridlösung. Hierbei tritt keine Färbung ein, wenn die Reaktion auf der Gegenwart von Ameisensäure oder Essigsäure beruhte. Bei Gegenwart von Rhodanwasserstoffsäure wird die ätherische, bei Vorhandensein von Acetessigsäure die wässerige Schicht rot gefärbt.

Nach Genuß von salicylsäurehaltigen Mitteln, Phenacetin, Antipyrin, Thallin und anderen ist die Reaktion nicht brauchbar.

Die Reaktion ist nicht besonders empfindlich. Für ihre praktische Verwendung am Krankenbett liegt aber darin eher ein Vorteil als ein Nachteil.

*b)* Reaktion von *Riegler*.[1]) Freie Jodsäure wird durch verschiedene Harnbestandteile, vor allem Harnsäure, unter Freiwerden von Jod reduziert.

---

[1]) *Riegler*, Neuere Reaktionen auf Acetessigsäure. Münchener med. Wochenschr. Bd. 53. S. 448 (1906).

Durch Acetessigsäure wird dieses aber auch bei saurer Reaktion sofort wieder gebunden.

Man versetzt 10 *cm*³ Harn mit 3 *cm*³ 10%iger Jodsäure, 3 *cm*³ Chloroform und schüttelt. Bei acetessigsäurefreien Harnen wird das Chloroform violett gefärbt, bei Gegenwart von Acetessigsäure bleibt es farblos.

Sehr verdünnte diabetische Harne enthalten manchmal zu wenig reduzierende Bestandteile, so daß der negative Ausfall der Reaktion nicht beweisend ist. *Riegler* selbst schlägt vor, in solchen Fällen zunächst ein Gemisch von normalem Harn, Jodsäure und Chloroform zu schütteln, dann den zu prüfenden Harn zuzufügen und nachzusehen, ob bei abermaligem Schütteln die violette Farbe des Chloroforms verschwindet. Einfacher ist es, nach *Lindemann*[1]) in solchen Fällen 10 *cm*³ des zu prüfenden Harns mit 5 Tropfen 30%iger Essigsäure deutlich anzusäuern, 5 Tropfen Jodjodkaliumlösung zuzusetzen und mit 2 *cm*³ Chloroform zu schütteln.

Die Reaktion ist empfindlicher als die *Gerhardt*sche und charakteristisch für Acetessigsäure. Ihr chemischer Verlauf ist noch nicht ganz aufgeklärt, wahrscheinlich aber entstehen Jodderivate des Acetons.

*c)* Reaktion von *Arnold*.[2]) Die Acetessigsäure reagiert mit Diazoverbindungen unter Austausch eines Wasserstoffatoms der Methylengruppe gegen die Benzolazogruppe.

$$\underset{\text{Acetessigsäure}}{\begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ CO \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \end{array}} + \underset{\text{p-Diazoacetophenonchlorid}}{Cl N_2 C_6 H_4 COCH_3} = \underset{\text{Acetophenon-p-azoacetessigsäure.}}{\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CO \\ | \\ CHN_2 C_6 H_4 COCH_3 + HCl \\ | \\ COOH \end{array}}$$

Unter den so entstehenden Verbindungen ist die Acetophenon-p-Azoacetessigsäure durch die Leichtigkeit ihrer Bildung und ihre intensiv violette Färbung ausgezeichnet.

Um die Reaktion anzustellen, bedarf man zweier Lösungen, nämlich erstens einer Lösung von 1 *g* p-Amino-Acetophenon in 2 *cm*³ starker Salzsäure und 100 *cm*³ Wasser, die wasserklar sein muß und zweitens einer 1%igen Lösung von Natriumnitrit. Man vermischt zwei Teile der ersten Lösung mit einem Teil der zweiten. Hierbei erfolgt die Diazotierung des Aminoacetophenons nach der Gleichung

$$\underset{\text{p-Aminoacetophenon}}{CH_3\,CO\,C_6\,H_4\,NH_2} + NO_2\,Na + 2\,HCl = \underset{\text{p-Diazoacetophenonchlorid}}{CH_3\,CO\,C_6\,H_4\,N_2\,Cl} + Na\,Cl + 2\,H_2\,O.$$

Fügt man zu diesem Reagens die gleiche Menge des zu prüfenden Harns und einige Tropfen konzentrierten Ammoniaks, so entsteht bei allen

[1]) *Riegler*, Zum Nachweis der Acetessigsäure im Harn. Münchener med. Wochenschrift. Bd. 52. S. 1386 (1905).

[2]) *Arnold*, Eine neue Reaktion zum Nachweis der Acetessigsäure im Harn. Wiener klin. Wochenschr. Nr. 20 (1899); Über Nachweis und Vorkommen der Acetessigsäure im pathologischen Harn. Zentralbl. f. innere Medizin. Bd. 21. S. 417 (1900).

Harnen eine mehr oder weniger intensive braunrote Färbung. Etwas von dieser rotbraunen Lösung wird nun mit einem starken Überschuß konzentrierter Salzsäure versetzt. Ist Acetessigsäure im Harn enthalten, so färbt sich die Mischung prachtvoll purpurviolett. (Je mehr Acetessigsäure vorhanden ist, desto mehr tritt das Violett hervor.) Bei Abwesenheit von Acetessigsäure schlägt durch den Salzsäurezusatz die braune Färbung in Gelb um, ohne eine Spur von Rotfärbung zu zeigen.

Bei sehr großem Gehalt an Acetessigsäure kann es bei dem Ammoniakzusatz zur Abscheidung eines amorphen braunen Körpers kommen, der in konzentrierter Salzsäure mit rein violetter Farbe löslich ist.

### 2. Quantitative Bestimmung der Acetessigsäure. (Getrennte Bestimmung von Acetessigsäure und Aceton.)

*a)* Im Harn. Die getrennte Bestimmung von Acetessigsäure und Aceton kann nach zwei verschiedenen Methoden ausgeführt werden, der von *Embden* und *Schliep* und der von *Folin.*

Methode von *Embden* und *Schliep.*[1]) Der Harn wird unter Vermeidung eines längeren Aufenthaltes in der Blase so frisch wie möglich untersucht. Mit 20 *cm*³ Harn (bei sehr hohem Acetongehalt mit 10 *cm*³, bei sehr niedrigem mit einer größeren Menge) wird eine Bestimmung des Acetons nach *Messinger-Huppert* vorgenommen: Bestimmung A (Gesamtaceton).

Eine gleichgroße Harnmenge wird in einen Rundkolben von 2 *l* gebracht und 130—150 *cm*³ Wasser hinzugefügt. Die Flüssigkeit wird unter möglichst niedrigem Druck aus einem Wasserbade, dessen Temperatur 34 bis 35° nicht übersteigt, während 30—35 Minuten destilliert (es sollen mindestens 60—65 *cm*³ übergegangen sein). Der Destillationskolben wird mit der Vorlage durch einen langen *Liebig*schen Kühler verbunden, die Vorlage mit Eis gekühlt. Durch Einleitung geringer Luftmengen mittelst einer Kapillare wird das Auftreten von Siedeverzug verhindert. Nach Beendigung der Vakuumdestillation wird mit dem Destillationsrückstand unter Überführung in ein geeignetes Destillationsgefäß ebenfalls eine Bestimmung nach *Messinger-Huppert* vorgenommen: Bestimmung B (Aceton aus Acetessigsäure).

Die Menge des präformierten Acetons ergibt sich als Differenz des Gesamtacetons und des Acetons aus Acetessigsäure.

*b)* Im Blut. *Embden* und *Engel*[2]) haben diese Methode auch auf das Blut angewendet. Die Fällung des Blutes mit Quecksilberchlorid und Salzsäure und die Bestimmung des Gesamtacetons geschah ganz in der oben, S. 915 angegebenen Weise.

Zur Bestimmung der Acetessigsäure wurde eine gemessene Menge des Filtrats mit Natronlauge genau neutralisiert und der Destillation im Vakuum in der eben geschilderten Weise unterworfen. Bei der großen

---

[1]) *Embden* und *Schliep*, Über getrennte Bestimmung von Aceton und Acetessigsäure. Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffwechsels. Nr. 7 u. 8 (1907).

[2]) *Embden* und *Engel*, Über Acetessigsäurebildung in der Leber. *Hofmeisters* Beitr. Bd. **11**. S. 323 (1908).

Flüssigkeitsmenge ist es notwendig, die Vakuumdestillation auf eine Stunde auszudehnen, wobei etwa 100 *cm*³ Flüssigkeit übergehen sollen.

Hiernach wird der Destillationsrückstand mit der der zur Neutralisation verbrauchten Natronlauge entsprechenden Salzsäurenmenge angesäuert und wiederum eine Bestimmung nach *Messinger-Huppert* vorgenommen (Aceton aus Acetessigsäure).

Auch hier ergibt sich natürlich die Menge des präformierten Acetons als Differenz des (nach S. 915 bestimmten) Gesamtacetons und des Acetons aus Acetessigsäure.

Berechnung. 1 *cm*³ Zehntelnormaljodlösung entspricht 1·701 *mg* Acetessigsäure.

Methode von *Folin.*[1]) Die *Folin*sche Trennung des präformierten Acetons von der Acetessigsäure beruht darauf, daß Aceton aus wässerigen Lösungen durch einen raschen Luftstrom fortgerissen wird, während die Acetessigsäure unbeeinflußt bleibt.

In einem hohen Glaszylinder werden 20 *cm*³ des zu untersuchenden Harnes mit 0·2—0·3 *g* Oxalsäure oder einigen Tropfen Phosphorsäure versetzt und mit wenig Petroleum überschichtet. Man verbindet nun mit der Vorlage — einer geräumigen Gaswaschflasche —, die 150 *cm*³ Wasser, 10 *cm*³ 40%ige Kalilauge und einen Überschuß von Zehntelnormaljodlösung enthält und saugt mit Hilfe einer kräftigen Saugpumpe während 20 bis 25 Minuten einen lebhaften Luftstrom durch den Apparat. Man säuert nun den Inhalt der Vorlage mit 25%iger Salzsäure an, gibt einige Tropfen Stärkelösung dazu und titriert in der oben, S. 913 beschriebenen Weise das unverbrauchte Jod mit Zehntelnormalthiosulfatlösung zurück (präformiertes Aceton).

Die Menge der Acetessigsäure ergibt sich aus der Differenz des nach *Messinger-Huppert* bestimmten Gesamtacetons und des präformierten Acetons.

Eine Fehlerquelle der Methode, auf die *Folin* selbst hingewiesen hat, ist die Notwendigkeit, das Kaliumhypojodit 25 Minuten stehen zu lassen. Wenn auch die Angaben über die Zersetzlichkeit solcher Lösungen sicher teilweise übertrieben sind, ist man doch vor Jodverlusten nicht sicher.

## III. Nachweis, Bestimmung und Isolierung der β-Oxybuttersäure.

Unabhängig voneinander gelang es *Minkowski*[2]) und *Külz*[3]), im Harn von Zuckerkranken β-Oxybuttersäure nachzuweisen, nachdem schon vorher *Stadelmann*[4]) aus diabetischem Harn α-Crotonsäure gewonnen hatte.

[1]) *Folin,* On the separate Determination of Acetone and Diacetic Acid in Diabetic Urines. Journal of Biological Chemistry. Vol. **3**. p. 177 (1907).

[2]) *O. Minkowski,* Über das Vorkommen von Oxybuttersäure im Harn bei Diabetes melitus. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **18**. S. 35 (1884).

[3]) *E. Külz,* Über eine neue linksdrehende Säure (Pseudooxybuttersäure), ein Beitrag zur Kenntnis der Zuckerharnruhr. Zeitschr. f. Biol. Neue Folge. Bd. **2**. S. 165 (1884).

[4]) *Stadelmann,* Über die Ursachen der pathologischen Ammoniakausscheidung beim Diabetes melitus und des Coma diabeticum. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **17**. S. 419 (1883).

Die Crotonsäure wurde von *Minkowski* als ein aus der Oxybuttersäure entstandenes Laborationsprodukt erwiesen, ihre Natur als α-Crotonsäure von *E. Külz*[1]) festgestellt.

Der letztgenannte Autor entdeckte auch die optische Aktivität der natürlichen β-Oxybuttersäure.

In kristallisiertem Zustand wurde die β-Oxybuttersäure zuerst von *Magnus-Levy*[2]) gewonnen.

Die l-β-Oxybuttersäure wird gewöhnlich nur als farbloser Sirup erhalten. *Magnus-Levy* ist es, wie eben erwähnt, gelungen, sie zur Kristallisation zu bringen. Die kristallisierte β-Oxybuttersäure stellt nach ihm[2]) glashelle plattenförmige Kristalle dar, die bei 47·5—48° zu sintern beginnen und bei langsamem Erhitzen bei 49—50° (unkorr.) schmelzen.

Die Säure löst sich leicht in Wasser, Äther, Äthylalkohol, Methylalkohol, Amylalkohol, Essigäther, Aceton und Essigsäure, nicht in Benzol, Toluol, Petroläther.

Sie ist sehr stark hygroskopisch. Die spezifische Drehung beträgt nach dem eben genannten Autor bei Temperaturen von 17—22° und Konzentrationen unterhalb 12% $[\alpha]_D = -24·12°$.

Von den Salzen der β-Oxybuttersäure sind mehrere kristallisiert erhalten worden, so namentlich das Silbersalz, das Natriumsalz, das Kaliumsalz, das Zinksalz, das Cadmiumsalz.

Von großer praktischer Bedeutung ist die Eigenschaft der β-Oxybuttersäure, unter Wasserabspaltung in α-Crotonsäure überzugehen. Die hierbei sich abspielende Reaktion wird durch folgende Gleichung ausgedrückt.

$$\underset{\beta\text{-Oxybuttersäure}}{CH_3\,CH\,OH\,CH_2\,COOH} = \underset{\alpha\text{-Crotonsäure.}}{CH_3\,CH = CH\,COOH} + H_2O$$

Diese Wasserabspaltung erfolgt bereits beim Erhitzen der β-Oxybuttersäure mit Wasser, leichter und vollständiger aber beim Erwärmen mit verdünnter Schwefelsäure.

Bei der Oxydation einer wässerigen β-Oxybuttersäurelösung durch Kochen mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure entsteht Aceton.

Bei der Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd und Ferrosulfat in der Kälte wird Acetessigsäure gebildet.

### 1. Nachweis der β-Oxybuttersäure.

#### *a)* Durch Überführung in α-Crotonsäure.

Für den Nachweis der β-Oxybuttersäure kommen die Reindarstellung und Kristallisation der freien Säure, welche ziemlich umständlich ist und

[1]) *E. Külz*, Zur Kenntnis der linksdrehenden Oxybuttersäure. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 18. S. 291 (1884).

[2]) *A. Magnus-Levy*, Untersuchungen über die Acidosis im Diabetes melitus und die Säureintoxikation im Coma diabeticum. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 45. S. 389 (1901).

in der praktischen Harnanalyse wohl nur wenig Anwendung findet, und die ebenfalls einigermaßen zeitraubende Darstellung und Analyse des Silbersalzes weniger in Betracht, als die Überführung der β-Oxybuttersäure in α-Crotonsäure nach der oben angegebenen Reaktionsgleichung.

Bisweilen wird diese Darstellung der Crotonsäure direkt am Harn, eventuell nach vorheriger Einengung, ausgeführt, indem der Harn mit dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure versetzt und der Destillation unterworfen wird.

Es ist zweckmäßig, hierbei das Volumen des Harnschwefelsäuregemisches durch dauerndes Zutropfenlassen von Wasser aus einem Tropftrichter einigermaßen konstant zu halten.

Aus den ersten Anteilen des Destillates scheidet sich bei genügender Abkühlung unter Umständen direkt die sehr charakteristisch riechende α-Crotonsäure ab. Stets ist sie sehr leicht zur Kristallisation zu bringen, wenn man das gewonnene Destillat mehrmals ausäthert — gewöhnlich bleiben nach etwa viermaliger Ausätherung nur sehr geringe Mengen der Säure in der wässerigen Lösung zurück — und den Äther der spontanen Verdunstung überläßt.

Die hierbei sich abscheidenden Kristalle haben bisweilen schon nach dem einfachen Abpressen auf dem Tonteller den richtigen Schmelzpunkt von 71—72°. Die Reinigung der Crotonsäure erfolgt nach unseren Erfahrungen sehr zweckmäßig in der Art, daß man die Substanz in Äther löst, die Hauptmasse des Äthers durch Erwärmen verjagt und die so gewonnene Flüssigkeit mit Petroläther fällt. Auf diese Weise können namentlich geringe Mengen flüchtiger Fettsäuren und ebenso auch verunreinigende Benzoesäure leicht beseitigt werden. Die bei der Destillation von Harn oder Harnätherextrakt aus Hippursäure frei gewordene Benzoesäure ist ebenso wie die Crotonsäure mit Wasserdämpfen leicht flüchtig und kristallisiert fast noch leichter als die Crotonsäure.

Nie darf man daher versäumen, den Schmelzpunkt der bei der Destillation erhaltenen Kristalle zu bestimmen. (Schmelzpunkt der Benzoesäure 121°, also nahezu 50° höher als der der α-Crotonsäure.)

### *b)* Durch Überführung in Acetessigsäure.

Wie bereits erwähnt, entsteht bei der Oxydation von β-Oxybuttersäure mit Wasserstoffsuperoxyd und Ferrosulfat Acetessigsäure. Die Acetessigsäure kann leicht mittelst der Eisenchloridreaktion nachgewiesen werden.

*Black*[1]) dampft 5—20 $cm^3$ des zu untersuchenden Harns auf dem Wasserbade bei gelinder Wärme auf $^1/_3$ bis $^1/_4$ des Ausgangsvolumens ein. Hierbei wird von vornherein etwa vorhandene Acetessigsäure zerstört.

[1]) *Black*, The detection and quantitative determination of β-oxybutyric acid in the urine. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 5. p. 207 (1908/09).

Die eingedampfte Flüssigkeit wird mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure angesäuert, mit gebranntem Gips zu einer dicken Paste verrieben und bis zur beginnenden Erstarrung sich selbst überlassen.

Die Masse wird gründlich zerstoßen und zweimal mit Äther unter Umrühren und Dekantation des gewonnenen Ätherextrakts extrahiert. Nach dem Verjagen des Äthers wird der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Bariumkarbonat neutralisiert. Das gewonnene, annähernd neutral reagierende Filtrat wird im Reagenzrohr mit 2 oder 3 Tropfen des gewöhnlichen Wasserstoffsuperoxyds versetzt. Nach dem Umschütteln werden alsdann wenige Tropfen einer 5%igen Ferrichloridlösung, welche eine Spur Ferrosalz enthält, zugesetzt.

Nach wenigen Sekunden tritt eine schöne rosa Färbung auf, welche allmählich stärker wird und nach Erreichung eines Maximums langsam verblaßt.

Nach *Black* kommt es bei der Ausführung der Reaktion wesentlich darauf an, daß die zu prüfende Lösung kalt und annähernd neutral ist und ferner darauf, einen großen Überschuß von Eisen und Wasserstoffsuperoxyd zu vermeiden. Wird zuviel Oxydationsmittel zugesetzt, so tritt die Färbung nur kurze Zeit oder auch gar nicht auf.

Nach den Angaben *Blacks* ist die Reaktion sehr empfindlich. Sie soll noch bei einer Verdünnung von 1:10.000 auftreten.

Der Gedanke, die β-Oxybuttersäure zum Zwecke ihres Nachweises zu der mittelst der Eisenchloridreaktion so leicht erkennbaren Acetessigsäure zu oxydieren, ist gewiß ein glücklicher. Wir haben die Versuche *Blacks* einer Nachprüfung unterzogen und können bestätigen, daß die von ihm angegebene Farbenreaktion bei stärkeren Konzentrationen an β-Oxybuttersäure recht deutlich ist.

Bei geringeren Konzentrationen dagegen erschien die Rosafärbung nur schwach und wurde bereits durch recht geringe Mengen überschüssigen Eisenchlorids undeutlich.

Die Reaktion wird viel deutlicher und empfindlicher, wenn man sie nicht, wie *Black*, am neutralisierten, sondern direkt am sauren Ätherextrakt nach dem Verjagen des Äthers anstellt. Es tritt dann nicht eine rosa Färbung, sondern fast augenblicklich die typische violette „Eisenchloridreaktion" ein. Am zweckmäßigsten verfährt man nach unseren Erfahrungen so, daß man dem sauren in Wasser aufgenommenen, eventuell durch Kochen von Acetessigsäure befreiten Ätherextrakt des Harns zunächst einige Tropfen Wasserstoffsuperoxyd und dann vorsichtig tropfenweise eine verdünnte, etwa 5%ige Ferrosulfatlösung zufügt. Da das Ferrosalz dabei zum Ferrisalz oxydiert wird, ist der besondere Zusatz eines Ferrisalzes unnötig. Man hört mit dem Zutropfen der Ferrosulfatlösung dann auf, wenn weiterer Zusatz keine Verstärkung der Färbung mehr hervorruft.

Neben dem Nachweis der β-Oxybuttersäure durch Überführung in α-Crotonsäure und Identifikation der letzteren mittelst Schmelzpunktbestimmung wird die von *Black* angegebene Farbenreaktion, namentlich in der eben geschilderten Modifikation, vielleicht mit Nutzen angewandt werden können.

## 2. Bestimmung der β-Oxybuttersäure.

Von den oben geschilderten Eigenschaften der β-Oxybuttersäure hat man drei zu ihrer quantitativen Bestimmung zu verwerten gesucht, und zwar:

*a)* die Überführung in α-Crotonsäure unter Wasserabspaltung,

*b)* die optische Aktivität,

*c)* die Oxydation zu Aceton mittelst Kaliumbichromat und Schwefelsäure.

*a)* Die Überführung von β-Oxybuttersäure in α-Crotonsäure nach der Reaktionsgleichung

$$\underset{\beta\text{-Oxybuttersäure}}{CH_3\,CHOH\,CH_2\,COOH} = \underset{\alpha\text{-Crotonsäure}}{CH_3\,CH = CH\,COOH} + H_2O$$

unter dem wasserentziehenden Einfluß von stärker konzentrierter Schwefelsäure hat *E. Darmstaedter* [1]) zu einer quantitativen Oxybuttersäurebestimmung im Harn zu benutzen versucht. Jedoch ist es späteren Autoren nicht gelungen, die von ihm gemachten Angaben zu bestätigen.

Wir selber haben neuerdings seine Methode nachgeprüft und müssen auf Grund dieser Nachprüfung die *Darmstaedter*sche Methode für so wenig brauchbar halten, daß sich eine genauere Schilderung der einzelnen in *Darmstaedters* Arbeit enthaltenen methodischen Angaben erübrigt.

*b)* Die weitaus am meisten angewandte Methode der β-Oxybuttersäurebestimmung ist die polarimetrische.

Man hat früher wohl versucht, einfach aus dem Umfange der Linksdrehung des Harns — nach Vergärung des von vornherein etwa vorhandenen Traubenzuckers — Schlüsse auf die Menge der ausgeschiedenen β-Oxybuttersäure zu ziehen, ein Verfahren, das aus verschiedenen Gründen sehr ungenau und heute allgemein verlassen ist.

Im Prinzip sind alle heute geübten polarimetrischen Bestimmungsmethoden der β-Oxybuttersäure überaus ähnlich. Alle suchen zunächst die β-Oxybuttersäure durch Äther zu extrahieren. Nach dem Verdunsten des Äthers wird der Rückstand in Wasser gelöst und die Lösung — wenn nötig, nach erfolgter Klärung bezüglich Entfärbung — polarimetrisch untersucht.

Ein Teil der Autoren geht so vor, daß der zu untersuchende Harn zunächst stark eingeengt und dann entweder direkt oder nach vorhergehender Behandlung mit besonderen Trockenmitteln mit Äther extrahiert wird.

α) Hierher gehört zunächst das Verfahren von *Bergell* [2]), das folgendermaßen ausgeführt wird. 100—300 $cm^3$ Harn werden bei schwach alkalischer Reaktion (Natriumkarbonat) auf dem Wasserbade zum Sirup ein-

[1]) *Ernst Darmstaedter*, Die quantitative Bestimmung der Oxybuttersäure im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **37**. S. 355 (1902/03).

[2]) *Peter Bergell*, Zur Bestimmung der Oxybuttersäure im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **33**. S. 310 (1901).

gedampft. Der Rückstand wird nach dem Erkalten zunächst unter Kühlung mit einem Phosphorsäuresirup, dann mit 20—30 *g* gepulverten, geglühten Kupfersulfats und 20—25 *g* sehr feinkörnigen Sandes verrieben, wodurch ein trockenes Pulver erhalten wird.

Die so getrocknete Substanz wird im Soxhletapparat mit wasserfreiem Äther vollständig erschöpft. Das Ätherextrakt wird nach dem Verjagen des Äthers mit wenig Wasser aufgenommen, durch Tierkohle entfärbt und polarisiert.

β) Auf einem ganz ähnlichen Prinzip beruht das von *Black*[1]) angewandte Verfahren, nur daß dieser Autor als Trockenmittel gebrannten Gips anwendet.

Die nach dem Einengen des Harns bei Wasserbadtemperatur gewonnenen Ätherextrakte sind aber meist außerordentlich stark gefärbt, und außerdem kann es beim Eindampfen des Harns unter Umständen zur Zerstörung von β-Oxybuttersäure kommen.

Es ist daher weit zweckmäßiger, die Extraktion der Oxybuttersäure direkt am angesäuerten Harn mittelst eines Flüssigkeitsextraktionsapparates vorzunehmen, zumal es neuerdings gelingt, durch Verwendung geeigneter Extraktionsapparate auch aus dem nicht eingeengten, mit Ammonsulfat gesättigten Harn die β-Oxybuttersäure quantitativ innerhalb weniger Stunden zu extrahieren.

γ) Nach *Magnus-Levy*. Nach *Magnus-Levy*[2]) wird der frische Harn mit 30—40 *g* Ammonsulfat und 10—15 $cm^3$ 20%iger Schwefelsäure auf je 100 $cm^3$ Harn versetzt und sofort in das Extraktionsgefäß übergeführt. Für größere Mengen empfiehlt *Magnus-Levy* den in Bd. 1, S. 181 dieses Handbuches beschriebenen Apparat von *Zelmanowitz*, dessen verschieden große Modelle Flüssigkeitsmengen von 300—1500 $cm^3$ auf einmal zu verarbeiten erlauben.

Für die Dauer der Ausätherung ist, wie *Magnus-Levy* hervorhebt, keine bestimmte Zeit anzugeben. Man muß in jedem einzelnen Falle die Beendigung der Extraktion kontrollieren.

Je nach der Stärke des Ätherstromes sind 24, 48 oder 72 Stunden notwendig. Man gießt nach je 24 Stunden den Äther aus dem Extraktionskölbchen durch ein trockenes Filter in eine jeweils neue Porzellanschale oder ein Becherglas ab und überläßt ihn der freiwilligen Verdunstung.

Ein Erhitzen auf dem Wasserbade ist nach *Magnus-Levy* besser zu unterlassen.

Der Ätherrückstand besteht aus einem Sirup, der meistens Kristalle von Hippursäure enthält. Er wird in 8—16 $cm^3$ Wasser aufgenommen, wodurch eine Trübung oder ölige Fällung entsteht, die sich in 12 bis 24 Stunden zum Teil kristallinisch absetzt. Davon wird in einen kleinen

[1]) *O. F. Black*, The Detection and quantitative determination of β-Oxybutyric acid in the urine. The Journ. of Biol. Chemistry. Vol. 5. p. 208 (1908/09).

[2]) *A. Magnus-Levy*, Die Acetonkörper. Ergebnisse d. inneren Med. u. Kinderheilk. Bd. 1. S. 416 (1908).

Meßzylinder abgegossen, mit möglichst wenig Wasser quantitativ nachgespült und auf 10 höchstens 20 $cm^3$ genau aufgefüllt.

Zur Klärung setzt *Magnus-Levy* eine kleine Messerspitze Kieselgur zu und filtriert durch ein dichtes Filter, bis ein klares Filtrat gewonnen wird. An diesem Filtrat wird die polarimetrische Bestimmung ausgeführt.

Über die Berechnung der β-Oxybuttersäuremenge aus dem Ablesungswinkel siehe unten S. 934.

Wenn der Äther der zweiten oder dritten Extraktion (nach 48 resp. 72 Stunden) nur noch einen ganz geringen Rückstand hinterläßt, dessen wässerige Lösung keine wesentliche Linksdrehung mehr zeigt, wird die Extraktion abgebrochen. Das ist nach *Magnus-Levy* meist nach zweimal, seltener nach dreimal 24 Stunden, in den seltensten Fällen auch dann noch nicht der Fall.

δ) Eigenes Verfahren. In ganz ähnlicher Weise wie *Magnus-Levy* haben auch wir seit Jahren stets den Harn ohne vorherige Einengung extrahiert. Zu diesem Zwecke wurde die zu untersuchende gemessene Harnmenge völlig oder nahezu völlig mit Ammonsulfat gesättigt, wozu auf je 100 $cm^3$ Harn 80—90 *g* Ammonsulfat zur Anwendung kamen, mit 25%-iger Schwefelsäure stark angesäuert und in den früheren Versuchen im *Kutscher-Steudel*schen Extraktionsapparat (siehe dieses Handbuch, Bd. 1, S. 181) extrahiert.

Zur erschöpfenden Extraktion waren 24—48 Stunden nötig. Das gewonnene Ätherextrakt wurde nach Filtration unter sorgfältigem Nachspülen mit Äther unter Zusatz von wenigen Kubikzentimetern Wasser auf dem Wasserbade destilliert, wobei jede stärkere Erhitzung sorgfältig vermieden wird.

Nach dem Verjagen des Äthers wird das Extrakt sofort unter der Wasserleitung gekühlt, unter quantitativem Nachspülen in einem Meßzylinder auf ein bestimmtes kleines Volumen aufgefüllt und durch ein kleines, dichtes Filter filtriert. Tritt nach öfterer Filtration keine vollkommene Klärung ein, so wird die Flüssigkeit mit einer ganz geringen Menge Tierkohle kurze Zeit in der Kälte geschüttelt, wodurch, wie wir uns überzeugt haben, keine Verluste an linksdrehender Substanz eintreten. Die polarimetrische Untersuchung der Flüssigkeit geschieht in der eben geschilderten Weise.

In jüngster Zeit ist es uns gelungen, die Extraktionsdauer ganz wesentlich abzukürzen, durch Anwendung eines von dem Präparator *Lind* konstruierten Extraktionsapparates. Die vollständige Extraktion geschieht in wenigen (6—8) Stunden, so daß man bei Anwendung des *Lind*schen Apparates, die wir dringend empfehlen möchten, außerordentlich rasch zum Analysenresultat gelangt.

Dieser Apparat ist dem von *Zelmanowitz* (siehe Bd. I, S. 181) angegebenen im Prinzip insofern ähnlich, als er ebenso wie dieser die zu extrahierende Flüssigkeit mit dem extrahierenden Äther dauernd aufs innigste vermengt, jedoch ist seine Konstruktion eine weit einfachere (siehe Fig. 271).

Beschreibung des *Lind*schen Apparates. Der Apparat besteht aus einem Erlenmeyerkolben *a*, in welchem das Lösungsmittel (in unserem Falle der Äther) verdampft. Der Dampf gelangt durch eine Röhre *c* in das Extraktionsgefäß *b*, wird in dem Kühler *d* kondensiert und tropft in die Auffangschale *g*. Von hier gelangt er durch eine Bohrung *h* in die Röhre *e*, welche in der Nähe ihres unteren Endes zwei mit ihr kommunizierende hohle Rührarme *i* trägt, die mit kleinen Austrittsöffnungen *k* versehen sind. Durch diese Austrittsöffnungen tritt der Äther, der aus der Auffangschale

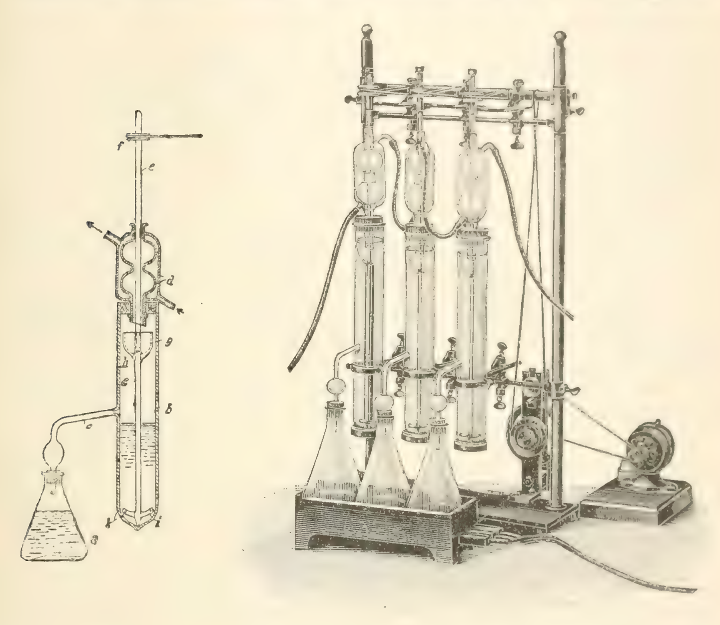



Fig. 271. Fig. 272.

in die Röhre *e* gelangt, in den zu extrahierenden Harn, passiert alsdann die Harnschicht und fließt dauernd durch die Röhre *e* in den Extraktionskolben zurück. Die Röhre *e* ist oberhalb des Kühlers mit einer Antriebsscheibe *f* versehen, vermittelst derer sie unter Anwendung eines Elektromotors und eines passenden Vorgeleges in dauernde, rasche Rotation versetzt wird.

Der aus den Enden der Rührarme austretende Äther wird dadurch außerordentlich fein verteilt, so daß er in sehr kleinen, bei genügender Rotation fast staubförmigen Tröpfchen die Flüssigkeit durchdringt.

Die Extraktion wird hierdurch derart beschleunigt, daß bereits nach 5 Stunden weit über 90% der aus dem Harn zu gewinnenden links-

drehenden Säure extrahiert waren und nach 8 Stunden der Harn mit Äther völlig erschöpft war.

Die Rotation der Rührspindel soll so rasch erfolgen, daß der in die Auffangschale gelangende Äther durch die Zentrifugalkraft eben nicht über den Schalenrand geschleudert wird.

In Fig. 272 sind mehrere derartige Apparate mit gemeinsamem Antrieb angeordnet. Es ist hierbei Sorge dafür getragen, daß jeder Apparat in und außer Betrieb gesetzt werden kann, ohne die Funktion der übrigen zu stören.

Bei Anwendung des *Lind*schen Apparates gelangt man schnell und mit sehr geringer Mühe in den Besitz der Analysenresultate.

Für die Beurteilung der polarimetrischen Bestimmung der β-Oxybuttersäure im sauren Ätherextrakt des Harns ist es vor allem nötig, zu wissen, ob von den optisch aktiven Substanzen des Harns wirklich nur die β-Oxybuttersäure in das Ätherextrakt übergeht.

Diese Frage müssen wir auf Grund bisher unveröffentlichter Untersuchungen verneinen. Jeder normale angesäuerte Harn gibt ein optisch aktives, und zwar linksdrehendes Ätherextrakt. Die linksdrehende Substanz besteht zum weitaus größten Teil jedenfalls nicht aus β-Oxybuttersäure, wenn auch bisher ebenfalls unveröffentlichte Versuche, die der eine von uns gemeinschaftlich mit *Oppenheimer* ausgeführt hat, es wahrscheinlich machen, daß β-Oxybuttersäure ein in sehr geringer Menge vorkommender Bestandteil des normalen Harns ist.

Der Betrag der nicht auf l-β-Oxybuttersäure zurückgehenden Linksdrehung ist immerhin recht erheblich. Ein Beispiel möge genügen.

600 $cm^3$ normalen Harns lieferten ein saures Ätherextrakt, das auf 15 $cm^3$ aufgefüllt, entsprechend einer Traubenzuckerlösung von 0·6% nach links drehte. Diese Linksdrehung würde, auf β-Oxybuttersäure und eine Tagesmenge von 1500 $cm^3$ bezogen, einer β-Oxybuttersäuremenge von annähernd 0·5 *g* entsprechen.

Wie bereits oben erwähnt, ist die Linksdrehung in Wahrheit aber sicher nur zum ganz geringen Teil auf β-Oxybuttersäure zu beziehen.

Ganz ähnliche Resultate wurden in sämtlichen übrigen, am normalen Harn angestellten Versuchen erhalten. Ein linksdrehendes, saures Ätherextrakt wird aus normalem Harn auch dann erhalten, wenn man den Harn vor der Extraktion mit Bleiessig und Ammoniak ausfällt, wodurch bekanntlich linksdrehende Substanzen, namentlich gepaarte Glukuronsäuren, beseitigt werden. Dementsprechend ist die polarimetrische Bestimmung der β-Oxybuttersäure bei Anwesenheit geringer Mengen dieser Substanz völlig unzuverlässig. Findet man z. B. polarimetrisch 1 *g* β-Oxybuttersäure in der Tagesmenge, so ist in Wahrheit vielleicht nur $^1/_2$ *g* vorhanden. Die Methode arbeitet also in diesem Falle mit einem Fehler von 50%.

Bei großen Oxybuttersäuremengen stören diese in jedem normalen Harn vorhandenen linksdrehenden ätherlöslichen Säuren sehr viel weniger. So würde bei einer Tagesmenge von 10 *g* β-Oxybuttersäure unter der Vor-

aussetzung, daß keine wesentliche Vermehrung der störenden linksdrehenden Substanzen vorhanden ist, der Fehler der polarimetrischen Methode auf etwa 5% reduziert sein.

Als das Endresultat unserer Ausführungen sind für die Bewertung der polarimetrischen β-Oxybuttersäurebestimmung folgende Schlußfolgerungen zu ziehen:

Die polarimetrische Bestimmung der β-Oxybuttersäure ist nur beim Vorhandensein größerer Mengen dieser Substanz im Harn anwendbar. Sie liefert — erschöpfende Extraktion vorausgesetzt — stets zu hohe Werte, jedoch beträgt der Fehler bei β-Oxybuttersäuremengen von mehr als 10 g in der Tagesmenge voraussichtlich weniger als 10%. Die Ausführung der polarimetrischen Bestimmung geschieht zweckmäßig in der von *Magnus-Levy* geschilderten Weise (siehe oben S. 929), besser noch und namentlich außerordentlich viel rascher mittelst des *Lind*schen Extraktionsapparates in der eben beschriebenen Art. Die Menge des zur Extraktion zu verwendenden Harns richtet sich naturgemäß nach dem zu erwartenden β-Oxybuttersäuregehalt.

Bei größeren β-Oxybuttersäuremengen wird man mit 300, ja mit 200 oder 100 *cm*³ Harn auskommen. Bei geringerem β-Oxybuttersäuregehalt wird man durch Verwendung größerer Harnmengen den durch die Ablesung am Polarimeter verursachten Fehler zwar verringern können, die durch die störende Beimengung linksdrehender Substanzen zum Ätherextrakt hervorgerufene Ungenauigkeit wird aber durch Verwendung größerer Harnmengen nicht vermindert.

Stets fülle man das Ätherextrakt auf ein so kleines Volumen auf, wie es der Inhalt der zu verwendenden Polarisationsröhre und die Eigenfärbung der Flüssigkeit gestattet.

Für einen stark β-oxybuttersäurehaltigen Harn gestaltet sich die Ausführung der Methode demnach etwa folgendermaßen:

100 *cm*³ Harn werden mit 90 *g* Ammonsulfat versetzt, mit 5 *cm*³ 25%iger Schwefelsäure angesäuert und im Ätherextraktionsapparat nach *Lind* 7 Stunden lang mit Äther extrahiert.

Zur Kontrolle der Vollständigkeit wird die Extraktion mit einer neuen Ätherportion während sieben weiterer Stunden wiederholt, jedoch wird man in diesem zweiten Extrakt keine merkliche Linksdrehung mehr konstatieren können.

Das gewonnene Ätherextrakt wird unter öfterem Nachspülen mit Äther in einen Destillationskolben quantitativ filtriert, mit 5 *cm*³ Wasser versetzt und unter sorgfältiger Vermeidung stärkerer Erwärmung der Äther abdestilliert. Der wasserhaltige Rückstand wird sofort unter der Wasserleitung abgekühlt, in einem Meßzylinder unter quantitativem Nachspülen auf 10—15 *cm*³ aufgefüllt, mit ganz wenig Tierkohle in der Kälte geschüttelt, filtriert und polarimetrisch untersucht. Die abgelesene Linksdrehung soll möglichst einer Traubenzuckerlösung von mindestens 2% entsprechen.

Bei Verwendung eines Polarisationsapparates, dessen Skala für 2 *dm* Rohrlänge Prozente Traubenzucker angibt, muß man, da die spezifische Drehung der Oxybuttersäure 2·18mal geringer ist als jene des Traubenzuckers, den abgelesenen Wert mit dem Faktor 2·18 multiplizieren, um auf Prozente β-Oxybuttersäure umzurechnen, während bei Anwendung eines Grade anzeigenden Polarisationsapparates und bei Anwendung eines 1 resp. 2 *dm*-Rohres der gefundene Drehungswinkel mit 4·146 resp. 2·073 zu multiplizieren ist.

*c)* Bestimmung der Oxybuttersäure durch Oxydation zu Aceton nach *Ph. Shaffer*.

Bei der Besprechung der Eigenschaften der β-Oxybuttersäure haben wir erwähnt, daß sie durch Kaliumbichromat und Schwefelsäure zu Aceton oxydiert wird. Dieses Prinzip hat erst in jüngster Zeit *Ph. Shaffer*[1]) zur Ausarbeitung einer quantitativen Bestimmungsmethode von β-Oxybuttersäure benutzt.

Versuche an reinen oder annähernd reinen β-Oxybuttersäurelösungen zeigten ihm, daß es für die quantitative Überführung der β-Oxybuttersäure in Aceton ganz wesentlich auf die Konzentration an Schwefelsäure und an Kaliumbichromat ankommt. Bei zu geringen Schwefelsäuremengen erfolgt die Oxydation zu Aceton nur sehr langsam und unvollständig, bei zu großen Schwefelsäuremengen wird nach der oben mehrfach besprochenen Reaktion ein wesentlicher Teil der β-Oxybuttersäure in α-Crotonsäure übergeführt und dadurch dem Nachweis als Aceton entzogen.

Eine nahezu quantitative Ausbeute an Aceton erhält man nach *Shaffer*, wenn man die Oxydation bei einem Schwefelsäuregehalt von etwa 5% vor sich gehen und das Kaliumbichromat in einer Lösung von 0·1—0·5% allmählich während der Destillation aus einem Tropftrichter zutropfen läßt. Die Geschwindigkeit des Zutropfens ist so zu wählen, daß das Volumen der Flüssigkeit dauernd annähernd konstant bleibt.

Für den Harn ist die in ihren technischen Einzelheiten noch genauer zu schildernde *Shaffer*sche Methode natürlich nur dann brauchbar, wenn außer β-Oxybuttersäure keine anderen Substanzen sich vorfinden, die beim Destillieren mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure in Aceton oder ähnliche jodoformbildende Substanzen übergehen.

Von vornherein vorhandenes Aceton und Acetessigsäure lassen sich leicht völlig entfernen, wenn man den Harn vor dem Beginn des Zusatzes der Kaliumbichromatlösung eine Zeitlang bei schwefelsaurer Reaktion destilliert.

Gepaarte Glukuronsäuren, die bei der Oxydation mit Schwefelsäure und Kaliumbichromat Aceton liefern sollen, können mit wenigstens annähernder Vollständigkeit durch Fällung mit Bleiessig und Ammoniak beseitigt werden.

[1]) *Ph. Shaffer*, A method for the quantitative determination of β-oxybutyric acid in the urine. The Journ. of Biol. Chemistry. Vol. 5. p. 211 (1908/09).

Als störende Substanz kam außerdem vor allem Traubenzucker in Betracht, der bei der Destillation mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure ein jodbindendes Destillat liefert. Nach *Shaffer* kann man diese störende Wirkung des Traubenzuckers dadurch beseitigen, daß man das bei der Destillation mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure gewonnene Destillat einer nochmaligen Destillation mit Wasserstoffsuperoxyd und Natronlauge unterwirft. Hierbei soll das Aceton unverändert in das zweite Destillat übergehen, die bei der Oxydation des Traubenzuckers entstandenen jodbindenden Produkte (vielleicht Formaldehyd und Ameisensäure) zerstört werden.

Auch Acetaldehyd, der als Oxydationsprodukt speziell von vornherein vorhandener Milchsäure auftreten könnte, wird unter Oxydation zu Essigsäure bei dieser zweiten Destillation zurückgehalten.

Ausführung der *Shaffer*schen Methode. Dementsprechend gibt *Shaffer* für die Ausführung seiner Methode folgende Vorschrift.

25—250 *cm*³ Harn, je nach dem zu erwartenden größeren oder geringeren β-Oxybuttersäuregehalt, werden in einem Meßkolben von 500 *cm*³ abgemessen und mit einem Überschuß von Bleiessig und 10 *cm*³ konzentrierter Ammoniaklösung versetzt. Nunmehr wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt, geschüttelt und filtriert.

Ein aliquoter, gemessener Teil des Filtrates, gewöhnlich 200 *cm*³, wird mit Wasser auf 400 *cm*³ aufgefüllt, alsdann werden 15 *cm*³ konzentrierte Schwefelsäure und Talkum hinzugefügt. Die Flüssigkeit wird destilliert, bis 200—250 *cm*³ übergegangen sind. (Destillat A.)

Der Destillationskolben (man verwendet praktisch Kjeldahlkolben von 800 *cm*³) muß mit einem Tropftrichter armiert sein, aus dem dauernd Wasser in die destillierende Flüssigkeit einfließt, um zu verhindern, daß sie einengt.

Das Destillat A enthält das präformierte Aceton und das Aceton aus Acetessigsäure.

Der Destillationsrückstand wird nunmehr einer zweiten Destillation unter Zutropfen von 400—600 *cm*³ einer 0·1—0·5%igen Kaliumbichromatlösung unterworfen. (Gewöhnlich werden 0·5 *g* Bichromat genügen, bei reichlichem Zuckergehalt oder Anwendung einer großen Harnmenge sind aber unter Umständen 2—3 *g* erforderlich.)

Wenn ungefähr 500 *cm*³ übergegangen sind (Destillat B), werden dem Destillat 20 *cm*³ 3%iges Wasserstoffsuperoxyd und einige Kubikzentimeter Natronlauge zugefügt und nochmals aus der alkalischen Lösung destilliert, bis 300 *cm*³ übergegangen sind. Das so gewonnene Destillat ($B_2$) wird nach *Messinger-Huppert* titriert.

Wir haben bisher lediglich die Angaben *Shaffers* wiedergegeben, müssen aber nunmehr ganz kurz die von ihm gewonnenen Resultate kritisch besprechen und die Ergebnisse einer von uns vorgenommenen, bisher unveröffentlichten Nachprüfung seiner Methode wiedergeben.

*Shaffer* gibt an, daß ihm bei Verwendung von reiner β-Oxybuttersäurelösung die annähernd quantitative Überführung von β-Oxybuttersäure in Aceton gelungen ist. In der überwiegenden Mehrzahl seiner Versuche hat er aber nicht völlig reine β-Oxybuttersäurelösungen verwendet und der Oxybuttersäuregehalt dieser Lösungen wurde ausschließlich mittelst der zu prüfenden Methodik ermittelt, was natürlich nicht angängig ist.

Da, wo *Shaffer* reine β-Oxybuttersäurelösungen verwendete, deren Konzentration er auf alkalimetrischem Wege feststellte, fand er in 5 Parallelbestimmungen unter ganz gleichartigen Versuchsbedingungen Acetonmengen, die zwar der alkalimetrisch bestimmten β-Oxybuttersäuremenge annähernd entsprachen, voneinander aber immerhin bis zu mehr als 4% abwichen.

Dieser Fehler der Methode würde aber an sich nicht sehr stark ins Gewicht fallen. Weit schwerwiegender sind die Bedenken, die wir gegen die direkte Anwendung der *Shaffer*schen Methode auf den zuckerhaltigen Harn erheben müssen. Im Gegensatze zu *Shaffer* fanden wir nämlich, daß die bei der Oxydation des Traubenzuckers mittelst Kaliumbichromat und Schwefelsäure unter den *Shaffer*schen Versuchsbedingungen auftretenden, flüchtigen, jodbindenden Substanzen bei der Redestillation mit Wasserstoffsuperoxyd und Natronlauge keineswegs vollständig zerstört resp. zurückgehalten werden, sondern das Resultat der Bestimmung außerordentlich stark beeinträchtigen.

Bei Verwendung reiner Traubenzuckerlösungen und einer Destillationsdauer, die der für die Ausführung der Shafferbestimmungen notwendigen etwa entsprach, fanden wir in dem zweiten Destillat stets sehr merkliche und wiederholt ganz beträchtliche Mengen Jod gebunden.

Bei der Anwendung der *Shaffer*schen Methode auf den zuckerhaltigen Harn stimmten die Parallelbestimmungen, die bei gleicher Konzentration an Schwefelsäure und gleichmäßigem Zufluß von Bichromat vorgenommen wurden, so wenig miteinander überein, daß wir die Anwendung der *Shaffer*schen Methode direkt auf den zuckerhaltigen Harn keineswegs empfehlen können.

Sehr gut miteinander übereinstimmende Resultate erhielten wir aber, wenn wir die Parallelbestimmungen an zuckerfreiem normalen Harn vornahmen, dem wir β-Oxybuttersäurelösungen hinzufügten, und namentlich an den sauren Ätherextrakten aus β-oxybuttersäurehaltigem Diabetikerharn.

Die von uns verwendeten Extrakte waren in der oben geschilderten Weise mittelst des *Lind*schen Extraktionsapparates gewonnen und hatten bereits zur polarimetrischen Bestimmung der β-Oxybuttersäure gedient. Wir konnten also hier die Resultate der polarimetrischen und der *Shaffer*schen Bestimmungsmethode unmittelbar miteinander vergleichen.

Bei stark β-oxybuttersäurehaltigen Harnen ergab sich zwar keineswegs eine völlige Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden — vielmehr war stets der polarimetrisch ermittelte Wert wesentlich höher als der mit der Oxydationsmethode gewonnene —, immerhin betrug aber hier der mit der *Shaffer*schen Methode erhaltene Wert stets über 80% und öfters mehr

als 90% der auf Grund der polarimetrischen Bestimmung zu erwartenden Menge. (Bei Anwendung der *Shaffer*schen Methode auf Ätherextrakte aus normalem oder schwach β-oxybuttersäurehaltigem Harn betrugen die nach *Shaffer* gewonnenen Werte nur einen geringen Bruchteil der polarimetrisch ermittelten.)

Nach den oben bei der Besprechung der polarimetrischen Methode gemachten Ausführungen unterliegt es keinem Zweifel, daß die polarimetrische Bestimmung der β-Oxybuttersäure zu hohe Werte liefert, während es uns auf Grund unserer Nachprüfungen und auch der eigenen Angaben *Shaffers* sehr möglich erscheint, daß die *Shaffer*sche Methode auch bei korrekter Durchführung etwas zu niedrige Resultate gibt.

Der richtige β-Oxybuttersäurewert dürfte dementsprechend in diesen Fällen zwischen dem polarimetrisch und dem durch Oxydation ermittelten liegen.

Für die Bestimmung der β-Oxybuttersäure im Harne schlagen wir auf Grund der im vorigen mitgeteilten Untersuchungsergebnisse und Erwägungen daher vor, die polarimetrische Untersuchungsmethode mit der *Shaffer*schen Oxydationsmethode zu kombinieren.

Dementsprechend würde zunächst in der oben S. 930 geschilderten Weise die polarimetrische Bestimmung vorgenommen werden. Von dem zur Polarisation benutzten Ätherextrakt wird alsdann eine Menge, die auf Grund des polarimetrisch ermittelten Wertes bei der Oxydation 40—50 *mg* Aceton liefern muß, zu einer Bestimmung nach *Shaffer* verwendet, wobei ganz in der oben S. 935 geschilderten Weise verfahren wird.[1])

Stets sind die Bestimmungen nach *Shaffer* doppelt auszuführen.

Als das Gesamtergebnis dieses Abschnittes möchten wir bezeichnen, daß es eine allen Anforderungen genügende Methode der β-Oxybuttersäurebestimmung zurzeit nicht gibt, daß aber beim Vorhandensein größerer Mengen der Säure mittelst der Kombination der polarimetrischen mit der *Shaffer*schen Methode immerhin annähernd exakte und namentlich für die klinische Praxis durchaus brauchbare Resultate gewonnen werden können.

## 3. Isolierung der β-Oxybuttersäure.

Für die Isolierung der β-Oxybuttersäure aus Harn geht man vom sauren Ätherextrakt aus.

Das Ätherextrakt wird am zweckmäßigsten ohne vorherige Einengung des Harnes nach Sättigung mit Ammonsulfat ganz in der für die Bestimmung der β-Oxybuttersäure oben geschilderten Weise gewonnen. Die weitere Verarbeitung des Ätherextraktes auf reine β-Oxybuttersäure ge-

---

[1]) Es ist zweckmäßig, das saure Ätherextrakt, ähnlich wie *Shaffer* es für den Harn angibt, zuerst mit Bleiessig und Ammoniak auszufällen, wobei, wie wir uns überzeugt haben, ein allerdings geringer Teil der linksdrehenden Substanz in den Niederschlag geht und zur Bestimung nach *Shaffer* einen gemessenen aliquoten Teil des gewonnenen Filtrates zu benutzen.

schieht im wesentlichen nach den von *Magnus-Levy*[1]) gemachten Angaben, denen wir im nachstehenden folgen:

Spuren etwa vorhandener Mineralsäuren werden durch Schütteln der ätherischen Lösung mit ganz geringen Mengen Wasser beseitigt.

Das Ätherextrakt enthält nach dem Verdunsten neben β-Oxybuttersäure namentlich Hippursäure, flüchtige Fettsäuren und vielleicht eine weitere bisher unbekannte Säure.

Die Hippursäure scheidet sich teils bereits bei der spontanen Verdunstung des Äthers ab, teils fällt sie beim Zusatz geringer Mengen Wassers aus.

Aus der von der Hippursäure abfiltrierten wässerigen Lösung werden die Fettsäuren durch Destillation mit Wasserdampf entfernt, die zurückbleibende wässerige Lösung mit Natronlauge neutralisiert, mit Tierkohle möglichst weitgehend entfärbt und eingedampft. Der rückständige Kristallbrei wird durch Alkohol entwässert und aus absolutem Alkohol (zuletzt unter Zuhilfenahme von Äther) umkristallisiert. Die hochgradige Hygroskopizität und die starke Verfilzung der Nadeln zu einem Brei, dessen Trocknung durch Absaugen mühsam ist, erschweren die Verarbeitung großer Mengen.

Aus dem durch genügend häufiges Umkristallisieren gereinigten Natriumsalz kann man durch Versetzen seiner konzentrierten Lösung mit Schwefelsäure die reine β-Oxybuttersäure gewinnen, die nach dem Verdunsten des Äthers und Trocknen im Exsikkator zunächst einen farblosen Sirup darstellt.

Es ist aber, wie bereits bei der Schilderung der Eigenschaften der l-β-Oxybuttersäure erwähnt wurde, *Magnus-Levy* gelungen, die l-β-Oxybuttersäure zur Kristallisation zu bringen. Ist man einmal im Besitz von Kristallen, so gelingt die Gewinnung weiterer Mengen kristallisierter β-Oxybuttersäure leicht, jedoch nur dann, wenn der Sirup nur noch wenig Wasser enthält.

Die Kristallisation erfolgt beim Reiben in wenigen Augenblicken durch die ganze Masse unter beträchtlicher Temperaturerhöhung bis zum Schmelzpunkt der Säure.

Die Trennung der Kristalle von der Mutterlauge ist nur durch Aufstreichen auf Tonplatten im Exsikkator möglich. Zur Reinigung wird die Oxybuttersäure in wenig Wasser oder Äther gelöst und abermals geimpft, bis die Substanz den richtigen Schmelzpunkt von 49—50° zeigt. (Siehe auch die oben S. 925 unter „Eigenschaften der β-Oxybuttersäure" gemachten Angaben.)

Für den Fall, daß sich neben β-Oxybuttersäure in dem sauren Ätherextrakt von Harn und namentlich von Organen andere organische Säuren von ähnlichen Löslichkeitsverhältnissen in Wasser und Äther — insbe-

[1]) *Magnus-Levy,* Untersuchungen über die Acidosis im Diabetes melitus und die Säureintoxikation im Coma diabeticum. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **45**. S. 390 ff. (1901).

sondere Milchsäure finden, schlägt *Magnus-Levy*[1]) folgendes Verfahren vor:

Die wässerige Lösung der Säuren wird mit kohlensaurem Kalk und etwas Kalkwasser, oder aber mit Baryt genau neutralisiert, wenn nötig auf ein kleines Volumen eingedampft (eventuell mit etwas Kalk oder Barytwasser alkalisch gemacht) und mit der 3—4fachen Menge Alkohol versetzt.

Die Flüssigkeit bleibt nun 12—24 Stunden stehen, wobei die Kalk- resp. Barytsalze der meisten im Extrakt enthaltenen Säuren, insbesondere auch die der Milchsäure, ausfallen, während das β-oxybuttersaure Salz in Alkohol von 60—80% und von noch höherer Konzentration vollständig löslich ist.

Das nach Abscheidung der ausgefallenen Kalksalze erhaltene alkoholische Filtrat wird bei neutraler Reaktion durch vorsichtiges Erwärmen vom Alkohol befreit, mit Schwefelsäure versetzt und dann von neuem in einem kleinen Extraktionsapparat mit Äther ausgezogen.

Man erhält auf diese Weise die β-Oxybuttersäure nur mit sehr geringen Mengen organischer Säuren verunreinigt und kann sie nach Einengung zum dicksten Sirup im Vakuumexsikkator fast ausnahmslos mittelst eines Impfkristalles zur Kristallisation bringen.

---

[1]) *Magnus-Levy*, A. Die Acetonkörper. Ergebnisse der inn. Med. und Kinderheilk. Bd. **1**. S. 418 (1908).

# E. Methoden zum Nachweis weiterer im Urin vorkommender Verbindungen mit Einschluß der wichtigsten körperfremden Stoffe.

Von **Hermann Hildebrandt**, Halle a. S.

## A. Allgemeiner Teil.

Dem Organismus von außen zugeführte Substanzen können entweder unverändert im Harn wieder erscheinen oder in veränderter Form, sei es mit verkleinertem oder vergrößertem Molekül, den Organismus wieder verlassen.

Der Nachweis, daß eine Substanz den Organismus unverändert verlassen hat, wird sich am einfachsten dadurch erbringen lassen, daß man die verabreichte Substanz aus dem Harn wiederzugewinnen vermag, wobei man sich der in der Chemie zur Identifizierung der Substanzen gebräuchlichsten Hilfsmittel bedient. Nur so wird man ein befriedigendes Ergebnis erhalten, da der qualitative Nachweis nicht ausschließt, daß daneben noch andere wesentliche Veränderungen derselben Substanz vor sich gegangen sind, die jedoch übersehen wurden.

Die chemischen Eigenschaften einer bestimmten Substanz weisen in jedem Falle die Richtung des Weges, welcher zu ihrer Isolierung einzuschlagen ist. Organische Säuren lassen sich zuweilen direkt durch Mineralsäuren, basische Körper durch Alkali ausfällen. Dieses Verfahren bietet die meiste Garantie, daß bei der Behandlung die aufzusuchende Substanz keine Veränderung erleide. Doch kann dieses Verfahren versagen, weil entweder die Verdünnung des zu untersuchenden Harns zu groß ist oder weil Substanzen im Harn vorhanden sind, welche die Ausfällung hindern. In diesem Falle kann ein zweckentsprechendes Einengen des Harns zum Ziele führen, wobei man aber darauf zu achten hat, daß man beim Fahnden nach einer Säure bei alkalischer Reaktion das Einengen des Harns vornimmt, beim Isolieren einer Base bei saurer Reaktion, um nach Möglichkeit einer Veränderung bzw. Verflüchtigung der gesuchten Substanz vorzubeugen. Der eingeengte Harn wird dann entweder direkt mit Säure bzw. Alkali gefällt oder mit Alkohol extrahiert, um die alkoholunlöslichen Bestandteile des Harns zu entfernen. Nach dem Wiederaufnehmen in Wasser gelingt es

unter Umständen, eine völlige Ausfällung herbeizuführen. Bei einigen Basen hat uns das Versetzen des auf ein möglichst kleines Volumen eingeengten Harns mit festem Stangenkali zum Ziele geführt, indem sich dann die gesuchte Base in fester Form ausschied. Der nach Darreichung von Tetramethylpyrrolincarbonsäureamid[1]) und seinem Reduktionsprodukt vom Kaninchen gelassene Harn wurde bei saurer Reaktion auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Natriumhydrat in Substanz versetzt, wobei die freie Basis sich ausschied, die dann mittelst Absaugens durch Leinwand von der Flüssigkeit getrennt und aus Toluol umkristallisiert wurde.

Flüchtige Säuren und Phenole kann man aus saurer Flüssigkeit überdestillieren, einzelne Basen aus alkalischer Flüssigkeit. Hierbei wird indessen stets zu berücksichtigen sein, daß bei diesem Verfahren durch die Säure- bzw. Alkaliwirkung die überdestillierte Substanz eventuell erst aus einer präformierten Substanz mit größerem Molekül abgespalten wurde und ferner, daß außerdem unter dem Einfluß jener Agenzien ein Kunstprodukt mit ganz anderen Eigenschaften entstanden sein kann, was namentlich beim Arbeiten mit den Bestandteilen ätherischer Öle zu berücksichtigen ist. *U. Mosso*[2]) sagt: Bevor die Tatsache bekannt war, daß das Phenol im Harn in Form einer gepaarten Verbindung auftritt, gelang es nicht immer, dasselbe nach der Einverleibung im Harn nachzuweisen, weil man den letzteren der Destillation unterworfen hatte, ohne ihm vorher eine genügende Menge von Säure zugesetzt zu haben. Der Harn enthielt scheinbar nur geringe Mengen und man nahm daher an, daß dasselbe im Organismus verbrannt würde. *E. Baumann*[3]) stellte fest, daß 100 $cm^3$ Pferdeharn, der mit Essigsäure stark angesäuert und mit überschüssigem Chlorbarium versetzt war, beim Abfiltrieren des Niederschlages nach zweitägigem Stehen in der Kälte 0·124 *g* schwefelsauren Baryt gaben. Als das saure Filtrat mit $^1/_3$ Volumen ziemlich starker Salzsäure versetzt wurde, blieb die Flüssigkeit zunächst noch klar; als dieselbe aber auf dem Wasserbade erwärmt wurde, färbte sie sich dunkler unter Ausscheidung eines Niederschlages. Letzterer wurde nach mehrstündigem Erwärmen heiß filtriert und mit heißem Wasser ausgewaschen. Er bestand aus schwefelsaurem Baryt, dessen Menge 0·234 *g* betrug. Ähnliches wurde bei Verarbeitung des menschlichen Harns gefunden. *F. Hoppe-Seyler*[4]) hat beobachtet, daß stark mit Essigsäure versetzter Harn beim Destillieren oder Schütteln mit Äther kein Phenol liefert, wohl aber nach dem Kochen mit Schwefelsäure. Nach Darreichung von Tribromphenol gab der Harn bei der

[1]) *Herm. Hildebrandt*, Über einige Synthesen im Tierkörper. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **44**. S. 315 (1900).

[2]) *U. Mosso*, Quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung der Salizylsäure und der Umwandlungsprodukte des Benzylamins aus dem tierischen Organismus. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **26**. S. 267 (1890).

[3]) *E. Baumann*, Über gepaarte Schwefelsäuren im Harn. *Pflügers* Arch. Bd. **12**. S. 69 (1876).

[4]) *F. Hoppe-Seyler*, Über das Vorkommen von Phenol im tierischen Körper und seine Einwirkung auf Blut und Nerven. *Pflügers* Arch. Bd. **5**. S. 470 (1872).

Destillation ein klares, farbloses Destillat, als derselbe aber nach Zusatz von Salzsäure destilliert wurde, ging ein milchig-trübes Destillat über und nach kurzer Zeit verstopfte sich der Kühler mit weißen, flockigen Kristallmassen, welche den Sp. und die Eigenschaften des Tribromphenols zeigten.

Bei der Destillation von Harn, welcher eine Uramidosäure enthält, ist zu berücksichtigen, daß bei stark saurer Reaktion eine Anhydridbildung stattfindet. So ist das von *H. Blendermann* [1]) aus dem Kaninchenharn nach Fütterung mit Tyrosin isolierte Tyrosinhydantoin höchstwahrscheinlich ein Kunstprodukt, insofern als nicht dieses, sondern die freie Hydantoinsäure (β-p-Oxyphenyl-α-uramidopropionsäure) primär auftritt.

Die erwähnten Momente machen sich nebeneinander geltend beim Destillieren des nach Darreichung von Sabinol [2]) gewonnenen Harns, wo als Umlagerungsprodukt der Sabinolglykuronsäure p-Cymol überging, welches bei nochmaliger Verabreichung beim Kaninchen zur Ausscheidung von Cuminsäure führte, die durch Destillation des angesäuerten Harns gewonnen werden konnte. Bei dieser Destillationsmethode gehen aus dem Harn namentlich Salzsäure bzw. Ammoniak über, was bei der weiteren Verarbeitung des Destillats zu berücksichtigen ist, falls nicht die gesuchten Substanzen direkt sich ausscheiden, so daß keine besondere Trennungsmethode notwendig wird.

An Stelle der Destillationsmethode wird in vielen Fällen das Ausschütteln des unbehandelten oder auch vorher behandelten Harns mit einer leichter flüchtigen, mit Wasser nicht mischbaren Substanz, wie Äther, Essigäther, Chloroform, vorzuziehen sein. Auch hierbei gehen Bestandteile des Harns oder der zugesetzten Schwefelsäure in den Äther und können beim Destillieren des Äthers zersetzend wirken.

Der auf seinen Gehalt an Chinin [3]) zu untersuchende Harn wurde nach Zusatz verdünnter Natronlauge bis zur ausgesprochen alkalischen Reaktion dreimal hintereinander mit je 50 $cm^3$ Äther gut ausgeschüttelt. Um die Trennung der Ätherauszüge vom Harn zu beschleunigen, wurde, wenn Emulsionsbildung eingetreten war, dem im Scheidetrichter befindlichen Gemisch eine geringe Menge Alkohol zugesetzt, wodurch die leicht sich bildende Emulsion wieder aufgehoben wurde und die Scheidung schneller vonstatten ging. Die auf diese Weise erhaltenen Ätherauszüge wurden vereinigt und filtriert, der Äther abdestilliert und der im Destillationskolben zurückgebliebene Rückstand bei 100° C unter Hindurchsaugen eines Luftstromes getrocknet. Der trockene Rückstand wurde nun zu wiederholten Malen mit Chloroform bei gelinder Wärme behandelt. Die filtrierten Chloroformauszüge wurden schließlich in einem tarierten Kristallisierschäl-

[1]) *H. Blendermann*, Beiträge zur Kenntnis der Bildung und Zersetzung des Tyrosins im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **6**. S. 234 (1882).

[2]) *H. Hildebrandt*, Sabinol, der Terpenalkohol des Ol. Sabinae. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **45**. S. 111 (1901).

[3]) *G. Giemsa* und *H. Schaumann*, Pharmakologische und chemisch-physiologische Studien über Chinin. Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. Bd. **11**. Beiheft 3 (1907).

chen unter Anwendung sehr geringer Wärme und Vermeiden des Siedens zur Trockene verdunstet und der verbleibende Rückstand bei 120° C getrocknet und gewogen, Sp. 172·8°.

Die Eigenschaft der Schwerlöslichkeit in Äther, aber Fällbarkeit durch Natronlauge aus wässeriger Lösung konnte im Falle des Cinchonins[1]) benutzt werden, um es direkt aus dem Harn auszufällen.

Um Substanzen basischer Art, welche im Organismus eine Paarung, z. B. mit Glykuronsäure, eingegangen sind, wiederzugeben, bedarf es einer vorhergehenden Spaltung mittelst Mineralsäuren. Erst nach erfolgter Spaltung wird alkalisch gemacht und die abgespaltene Base der Flüssigkeit durch Äther entzogen. Es gelingt in dieser Weise festzustellen, ob der basische Körper nebenbei selbst eine Veränderung erfahren hat, wie es seinerzeit bei dem Kondensationsprodukt aus Piperidin und Phenolen[2]) mittelst Formaldehyd festgestellt wurde.

Um phenolartige Körper, welche im Organismus an Schwefelsäure gebunden sind, wiederzuerhalten, versetzt man den Urin mit starker Mineralsäure und treibt das Phenol mit Wasserdampf über. Das nach Darreichung von Guajakol[3]) im Harn auftretende Produkt konnte in dieser Weise direkt durch Titration quantitativ bestimmt werden. Es wurde dabei die Eigenschaft des Guajakols benutzt, in schwachsaurer Lösung durch p-nitrodiazobenzol in Gegenwart von Natriumacetat einen unlöslichen gelben Azofarbstoff zu bilden. Fährt man mit dem Zusatz von Paranitrodiazobenzol so lange fort, bis eine filtrierte Probe mit einer alkalischen Lösung der R-Säure eben einen roten Azofarbstoff bildet, so entspricht ein Molekül des Diazokörpers genau einem Molekül Guajakol. Die Bestimmung des Endpunktes der Titration geschieht durch die Tüpfelmethode.

Die zersetzende Einwirkung der Schwefelsäure auf organische Verbindungen kann man dadurch vermeiden, daß man nach Extraktion der angesäuerten Flüssigkeit mit Äther diesen unter Zusatz von trockenem Bariumkarbonat abdestilliert, den Rückstand mit Wasser aufnimmt, wobei sich nur die löslichen Bariumsalze im Filtrate finden. Beim Ausschütteln des Harns mit Äther bildet sich leicht eine Zwischenschicht, die erst nach Zusatz von Alkohol sich klärt; aber eben der Zusatz von Alkohol bringt noch andere Bestandteile des Harns in die Ätherschicht, was die weitere Verarbeitung stören kann.

Sucht man nach Säuren, so kocht man zweckmäßig erst den Harn mit Ammoniak auf, macht mit Phosphorsäure sauer, äthert aus und destilliert dann den Äther ab. Dieses Verfahren bewährte sich uns bei der

[1]) *H. Hildebrandt*, Zur Pharmakologie der Chinatoxine. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **59**. S. 127 (1908).

[2]) *H. Hildebrandt*, Über einige Synthesen im Tierkörper. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **44**. S. 279 (1900).

[3]) *Th. Knapp* und *F. Suter*, Experimentelle Untersuchungen über die Resorptions- und Ausscheidungsverhältnisse einiger Guajakolderivate. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **50**. S. 332 (1903).

Darstellung der Stoffwechselprodukte halogensubstituierter Toluole[1]), bei denen die entsprechenden, im Organismus gebildeten Benzoesäuren teils frei, teils mit Glykokoll gepaart aus dem Harn mittelst dieses Verfahrens isoliert werden konnten.

Der nach Eingabe der Oxysäuren[2]) erhaltene Harn wurde etwas eingedampft, mit Salzsäure versetzt und mit alkoholhaltigem Äther ausgeschüttelt, der Rückstand der so erhaltenen Extrakte wurde mit absolutem Äther aufgenommen, der die unveränderten Oxybenzoesäuren löst, die Glykokollverbindungen aber zurückläßt; letztere wurden aus Wasser umkristallisiert. Gewöhnlich bedient man sich, um aus dem Harn mit Glykokoll gepaarte Säuren zu extrahieren, des Essigäthers[3]), welcher die Hälfte seines Volumens Äthyläther enthält. Der Auszug enthält nur sehr geringe Mengen von Harnstoff, welche durch Behandeln mit schwach erwärmtem absoluten Essigäther leicht abgeschieden werden können. In vielen Fällen ist eine wiederholte Extraktion des Harns nötig, um die Umsetzungsprodukte vollständig aus dem Harn abzusondern. Als Verunreinigungen können schmierige Substanzen auftreten und geringe Mengen anorganischer Bestandteile. Die so erhaltene Lösung wird durch Eindampfen vom Essigäther befreit und der Rückstand solange mit absolutem Äther behandelt, als derselbe noch etwas aufnimmt. Im ungelösten Teil befindet sich dann die gepaarte Verbindung, in der Lösung die übrigen Umsetzungsprodukte. Wenn man diese Lösung mit einer wässerigen Lösung von kohlensaurem Natron wiederholt ausschüttelt, so nimmt letztere die entstandenen Säuren auf, die Phenole bleiben in der ätherischen Lösung. Auf diese Weise gelingt es auch, aus dem Destillat des angesäuerten Harns die Phenole von sauren Bestandteilen zu trennen und weiterhin mittelst Alkalis die übergegangenen Phenole von Kohlenwasserstoffen zu trennen.

Bei leicht spaltbaren, gepaarten Verbindungen kann man nach dem Vorgehen von *P. Pellacani*[4]) derart verfahren, daß man die mit Schwefelsäure versetzte, noch verunreinigte Lösung der gepaarten Verbindung bei gewöhnlicher Temperatur sich selbst überläßt und ab und zu mit Äther ausschüttelt. Zur Gewinnung des Spaltungsproduktes der Kamphoglykuronsäure fällte *Pellacani* den nach Darreichung von Kampfer gewonnenen Harn erst mit basisch-essigsaurem Blei und alsdann mit Ammoniak. Der gut ausgewaschene ammoniakalische Bleiniederschlag wird durch Schwefelwasserstoff zersetzt, die filtrierte Flüssigkeit, welche die vom Kampfer sich ableitenden Säuren enthält, wird eingedampft und die Flüssigkeit in Gegen-

[1]) *H. Hildebrandt*, Über das Verhalten halogensubstituierter Toluole und der Amidobenzoesäuren im Organismus. Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. Bd. 3. S. 365 (1902).

[2]) *Baumann* und *Herter*, Über die Synthese von Ätherschwefelsäuren und das Verhalten einiger aromatischer Substanzen im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 1. S. 261 (1877).

[3]) *O. Kühling*, Über Stoffwechselprodukte aromatischer Körper. Inaug.-Dissert. Berlin 1887.

[4]) *P. Pellacani*, Zur Pharmakologie der Kampfergruppe. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. 17. S. 369 (1883).

wart von Salzsäure wochenlang einer Temperatur von 60° C überlassen. Während dieser Zeit wird dann täglich mittelst Äther eine gewisse Menge des in letzterem löslichen Spaltungsproduktes ausgezogen. Der Äther wird mit kohlensaurem Natron und Wasser ausgewaschen und hierauf destilliert. Der rasch kristallisierende Rückstand wird alsdann in Wasser gelöst und mittelst Kohle entfärbt. Aus der wässerigen Lösung wird es abermals und nunmehr in reinem Zustande durch Äther ausgezogen; das so gewonnene Campherol zeigt einen eigentümlichen Geruch und sublimiert vor dem Schmelzen.

In vielen Fällen kann man die zu isolierende Substanz durch Überführung in eine schwer lösliche Verbindung zunächst von einem großen Teil der übrigen Harnbestandteile trennen und den gut ausgewaschenen Niederschlag weiter verarbeiten. Von Schwermetallsalzen hat namentlich das neutrale und basische essigsaure Blei vielfach Anwendung gefunden; vor allem zur Abscheidung gepaarter Glykuronsäuren ist dieses Verfahren unentbehrlich geworden. Aber auch andere organische Säuren, die sich im Organismus bilden, können in dieser Weise isoliert werden, so die nach Darreichung von Citral[1]) durch zweifache Oxydation (der Aldehyd- und einer Methylgruppe) entstehende zweibasische Säure sowie einzelne Glykokollverbindungen.

Es sind bereits eine große Anzahl verschiedenartiger chemischer Prozesse im Tierkörper bekannt, welche die Veränderung einer zugeführten Substanz bedingen, und wir können immerhin auf Grund von Analogieschlüssen unser Verfahren bei der Isolierung der Stoffwechselprodukte einrichten; doch ist zu berücksichtigen, daß unter Umständen eine geringfügige Änderung im Molekül einen ganz anderen Verlauf der chemischen Umwandlung im Organismus bedingt.

Es sei hier erinnert an das verschiedene Verhalten von para- und meta-Cymol[2]) im tierischen Organismus; ersteres erfährt eine Oxydation der Methylgruppe, bei letzterem erfolgt eine Oxydation im Benzolkern. Dieselbe Substanz kann mehreren nebeneinander einhergehenden Umwandlungen unterliegen, deren Folge entweder eine doppelte Veränderung im Molekül oder das Entstehen zweier oder mehrerer Umwandlungsprodukte im Organismus ist. Dieselbe Substanz kann zum Teil die Paarung mit Ätherschwefelsäure, zum Teil mit Glykuronsäure eingehen, und bei den verschiedenen Tierarten kann der eine Prozeß gegenüber dem anderen völlig zurücktreten. Demnach sind, wenn man eine neue Verbindung hinsichtlich ihrer Umwandlungsprodukte im Organismus untersuchen will, alle diejenigen Erfahrungen zu berücksichtigen, welche man schon mit den bereits bekannten analog gebauten gesammelt hat. Es sind alle Möglichkeiten ins Auge zu fassen, um danach den Gang der Untersuchung ein-

[1]) *H. Hildebrandt*, Über Synthesen im Tierkörper. 2. u. 3. Mitteil. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. 45. S. 121 und Bd. 46. S. 261 (1901).

[2]) *H. Hildebrandt*, Über das Schicksal einiger zyklischer Terpene und Kampfer im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36. S. 460 (1902).

zurichten: es kann freilich hierbei keineswegs ausbleiben, daß man auf gänzlich neue Arten der Umwandlung im tierischen Organismus aufmerksam wird, und gerade hierin scheint uns der Reiz dieses Teiles der wissenschaftlichen Pharmakologie zu liegen. Wir dürfen nicht vergessen, daß die bisher gewonnenen Ergebnisse nur einen Teil derjenigen Prozesse umfassen, welche seitens des Tierkörpers gegenüber einer bestimmten Substanz in Bewegung gesetzt werden.

Wir kennen auch Verbindungen, welche im Organismus einer vollständigen Verbrennung unterliegen; in diesem Falle werden wir auch keine intermediären Stoffwechselprodukte im Harn nachweisen können. Dabei muß natürlich besonders ermittelt werden, ob die eingegangene Verbindung zur Resorption gekommen ist. Vom Phenol war behauptet worden, daß es im Organismus außer der Paarung mit Schwefelsäure eine energische Oxydation erleide, als deren Produkte Kohlensäure und vielleicht auch Oxalsäure erscheinen sollten. Eine solche Oxydation war bei dem leicht oxydierbaren Brenzcatechin in noch höherem Maße zu erwarten. Versuche am Kaninchen, das bei Milchfütterung kein Brenzcatechin im Harn enthielt, wurden in der Weise angestellt, daß nur einige Milligramm Brenzcatechin zugeführt wurden.[1] Zur Prüfung auf Brenzcatechin wurde der Harn eine Stunde lang auf dem Wasserbade mit Salzsäure gekocht, nach dem Erkalten mit Äther extrahiert, der Extrakt nach dem Verdunsten des Äthers in Wasser gelöst, filtriert, das sauer reagierende Filtrat durch Natriumkarbonat schwach alkalisch gemacht, mit Äther geschüttelt, der Ätherrückstand nach dem Abdunsten des Äthers auf Brenzcatechin mittelst Eisenchlorid geprüft, welches grün und nach Zusatz von Ammoniumkarbonat violett gefärbt wird. Schon bei Eingabe von 4 *mg* trat eine deutliche Reaktion auf, bei Eingabe von 10 *mg* fiel sie weit intensiver aus. Also die leichtoxydierbarsten aromatischen Verbindungen können sich schon in sehr geringen Mengen den Oxydationsprozessen im Tierkörper in eigentümlicher Weise entziehen.

Die Bernsteinsäure wurde nach Zufuhr mit der Nahrung weder im Harn noch in den Fäzes wiedergefunden, so daß der Schluß gezogen wurde, daß im Organismus eine vollständige Zerlegung[2] erfolgt. Zum Nachweis der Bernsteinsäure wurde der Harn eingedampft, dann mit Salzsäure angesäuert und mit Äther geschüttelt; der Ätherrückstand wurde mit kohlensaurem Kalk und Wasser aufgeschwemmt und einige Minuten gekocht, um die Bernsteinsäure in das Kalksalz überzuführen und dann heiß filtriert.

Es sind einige Methoden der Untersuchung bekannt, welche uns im allgemeinen über das Schicksal gewisser dem Organismus einverleibter Verbindungen orientieren können.

[1] *D. de Jonge*, Weitere Beiträge über das Verhalten des Phenols im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3. S. 177 (1879).

[2] *von Longo*, Über das Verhalten des Asparagins und der Bernsteinsäure im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3. S. 177 (1879).

Im 24stündigen Hundeharn ist das Verhältnis von C:N ein recht konstantes; erscheint eine verfütterte Substanz ganz oder teilweise im Harn wieder, so verschiebt sich das Verhältnis C:N und die Bestimmung des Quotienten C:N der Versuchstage im Vergleich zu dem Quotienten C:N der Vor- und Nachperiode liefert Anhaltspunkte zur Berechnung, wieviel von der verfütterten Substanz im Harn wieder aufgefunden wird. *E. Friedmann*[1]) hat dieses Verfahren benutzt, um die Menge der verfütterten Substanzen zu bestimmen, die den Körper unverändert passieren, und diese Bestimmung wurde, soweit es möglich war, durch Isolierung der ausgeschiedenen Substanz kontrolliert. Nach Verfütterung der α-Aminosäuren vom Glykokoll bis zur α-Amino-n-capronsäure war vollständige Ausnutzung dieser Substanzen zu konstatieren mit Ausnahme des höchsten Gliedes. Die normalen methylierten d-l-α-Aminosäuren werden weniger gut ausgenutzt, am wenigsten die höheren Glieder.

Manche Substanzen bewirken, dem Tierkörper zugeführt, eine beträchtliche Vermehrung der Ätherschwefelsäuren, eventuell gänzliches Verschwinden der präformierten Schwefelsäuren. Da nun das Verhältnis der präformierten zu den gebundenen Schwefelsäuren kein konstantes ist, so ist es zum Nachweis der Bildung von Äthersäuren erforderlich, das jedesmalige Verhältnis im normalen Harn an den der Fütterung vorausgehenden Tagen zu prüfen und die gewonnenen Resultate mit den nach der Fütterung erhaltenen zu vergleichen. Aus der Menge der ausgeschiedenen Ätherschwefelsäure läßt sich berechnen, ein wie großer Anteil der eingeführten Substanz in Form von Äthersäuren ausgeschieden wurde. Die Bildung von Ätherschwefelsäure durch eine dem Tierkörper einverleibte Substanz kann daher nur dann mit Sicherheit erschlossen werden, wenn der darauf entleerte Harn bedeutend mehr gepaarte Schwefelsäure enthält als unter normalen Verhältnissen und die in Form von Sulfaten ausgeschiedene Schwefelsäure gleichzeitig erheblich vermindert war bzw. verschwunden ist.[2])

Die Bestimmung der gepaarten Schwefelsäure neben der in Form von Sulfaten im Harn enthaltenen Schwefelsäure geschieht nach *E. Baumann*[3]) in folgender Weise: 50 *cm*³ Harn werden mit Essigsäure stark angesäuert, mit überschüssigem Chlorbarium versetzt und auf dem Wasserbade eine Stunde lang gelinde erwärmt; hierauf wird der Niederschlag, der neben schwefelsaurem Baryt oxalsauren Kalk (phosphorsaures Eisen) Harnsäure enthalten kann, abfiltriert und zuerst mit Wasser, dann mit erwärmter verdünnter Salzsäure und dann wieder mit Wasser ausgewaschen.

---

[1]) *E. Friedmann*, Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper. Beitr. z. chem. Physiol. Bd. **11**. S. 151 (1908).

[2]) *E. Baumann* und *Herter*, Über die Synthese von Ätherschwefelsäuren und das Verhalten einiger aromatischer Substanzen im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **1**. S. 244 (1877).

[3]) *E. Baumann*, Über gepaarte Schwefelsäuren im Organismus. *Pflügers* Archiv. Bd. **13**. S. 285 (1876).

Der so von anderen Salzen befreite schwefelsaure Baryt wird geglüht und gewogen: aus seinem Gewichte berechnet sich die Menge der in Form von Sulfaten im Harn enthaltenen Schwefelsäure. Das mit den Waschwässern vereinigte Filtrat wird nun mit konzentrierter Salzsäure (ca. $^1/_8$ Volumen) versetzt und 1 Stunde lang auf dem kochenden Wasserbade erwärmt; dabei färbt sich die Flüssigkeit mehr oder weniger dunkel, es scheidet sich aus derselben schwefelsaurer Baryt ab, daneben aber stets Flocken harzartiger oder amorpher Körper. Dieser zweite Niederschlag wird nach dem Abfiltrieren erst mit heißem Wasser, dann mit warmem Weingeist und zuletzt wieder mit Wasser ausgewaschen. Der warme Weingeist löst die mitgefällten harzigen Verbindungen auf, welche, namentlich wenn ihre Menge erheblich ist, stets etwas von den anderen Salzen der Flüssigkeit mit niederreißen und beim Auswaschen mit Wasser zurückhalten. Aus dem Gewichte des nun wieder geglühten Rückstandes berechnet sich die Menge von Schwefelsäure, welche durch die Zerlegung der gepaarten Schwefelsäuren gebildet worden ist.

Unter Umständen kann es von Wichtigkeit sein, das Verhältnis der freien und gebundenen Schwefelsäure zum Gesamtschwefelgehalt des Harns kennen zu lernen, um durch die Differenz die Menge der im Harn enthaltenen organischen schwefelhaltigen Verbindungen (neutraler Schwefel-d) festzustellen. Letzteres läßt sich ermitteln, wenn man vom Gesamtschwefelgehalte des Harnes in Abzug bringt den reziproken Wert für:

*a)* präformierte, einfache Schwefelsäure,

*b)* gepaarte Schwefelsäure,

*c)* unterschweflige Säure (falls auch solche vorhanden ist).

Nach ***Harnack*** und ***Kleine***[1]) läßt sich eine Bestimmung von a + c in folgender Weise ausführen: Es wird Chlorbarium zum Harn im Überschuß und ca. 15—20 *cm*³ konzentrierte Essigsäure zugesetzt, das Ganze auf dem Wasserbade ca. 24 Stunden erwärmt, damit der Niederschlag vollständig ausfällt; der abfiltrierte Niederschlag wird mit verdünnter Essigsäure und heißem Wasser sorgfältig ausgewaschen, hierauf wird in bekannter Weise verbrannt und gewogen. Zur Berechnung von c wird vom Gesamtwert der Wert a abgezogen und die Differenz in dem Verhältnis von schwefligsaurem zu schwefelsaurem Baryt umgerechnet. Diese Methode beruht auf dem Umstande, daß die unterschweflige Säure im angesäuerten Harn ziemlich rasch, jedenfalls binnen 24 Stunden in schweflige Säure übergeht und daß der gebildete schwefligsaure Baryt zwar in Salz-, aber nicht in Essigsäure löslich ist, in welcher sich aber phosphorsaurer Baryt löst. Ein Teil der unterschwefligen Säure scheidet sich in Form von freiem Schwefel ab, da sie durch Säuren unter Bildung von Schwefel und Schwefeldioxyd zersetzt wird. Der Schwefel wird als solcher mitgewogen und als schwefligsaurer

[1]) *E. Harnack* und *F. K. Kleine*, Über den Wert genauer Schwefelbestimmungen im Harn für die Beurteilung von Veränderungen des Stoffwechsels. Zeitschr. f. Biologie. Bd. 37. S. 417 (1899).

Baryt in Rechnung gebracht. Unter dem Einfluß von der Nahrung zugefügtem Alkalikarbonat wurde eine beträchtliche Vermehrung der unterschwefligen Säure und eine Zunahme des oxydierten Schwefels überhaupt gefunden.

Findet man keine oder nur geringe Vermehrung der Ätherschwefelsäuren nach Einfuhr einer Verbindung in den Organismus, so ist in jedem Falle auf gepaarte Glykuronsäuren zu prüfen. Wir besitzen eine große Anzahl von Kennzeichen für das Vorliegen einer gepaarten Glykuronsäure:

1. Linksdrehung des ganzen mit Bleizucker gereinigten Harns, aus deren Größe man, wenn der Paarling keine erhebliche Eigendrehung zeigt, einen ungefähren Schluß auf die Menge der gepaarten Glykuronsäure ziehen kann. Wenn der Paarling selber eine starke Rechtsdrehung besitzt, so zeigt sich bei der gepaarten Verbindung eine erhebliche Abnahme dieser Rechtsdrehung, ohne daß es zu einer Linksdrehung im gewöhnlichen Sinne kommt (also eine relative Linksdrehung).[1]

2. Nach der Spaltung mit Mineralsäure Rechtsdrehung und Reduktion der *Fehling*schen Lösung; dazu ist zu bemerken, daß die meisten gepaarten Glykuronsäuren nicht die *Fehling*sche Lösung direkt reduzieren, sondern erst nach der Spaltung.

3. Spaltung auch durch Emulsin[2], bei einzelnen auch durch Hefe[3], wobei die reduzierende Glykuronsäure selbst verschwinden kann. Jedenfalls ist man nicht berechtigt, zu schließen, daß wenn nach der Säurespaltung und Vergärung keine Reduktion der *Fehling*schen Lösung nachweisbar ist, eine gepaarte Glykuronsäure ausgeschlossen sei. Nach der Spaltung der gepaarten Glykuronsäure ist es zweckmäßig, den Paarling zu isolieren und ihn mit der ursprünglichen Substanz zu vergleichen. Gibt der Harn nach dem Bleiverfahren (erst Fällung mit neutralem Bleiacetat, dann Fällung des Filtrates mit Bleiessig) einen voluminösen basischen Bleiniederschlag, so ist das Vorhandensein einer gepaarten Glykuronsäure wahrscheinlich: man zersetzt einen kleinen Teil mit Schwefelsäure, filtriert vom Bleisulfat ab und kocht einige Minuten über der freien Flamme. Nach dem Filtrieren der abgekühlten Lösung setzt man eine Lösung von verdünntem Kupfersulfat hinzu, macht mit einer Seignette-Salz-Alkalilösung alkalisch und kocht nochmals; bei diesem Verfahren braucht man nicht zu besorgen, daß beim Alkalischmachen der Flüssigkeit die entstandene freie Glykuronsäure zersetzt wird, da bereits gelöstes Kupfersalz zugegen ist; zu bemerken ist aber, daß eine Reduktion allein nicht beweisend ist, da auch

[1]) *H. Hildebrandt*, Über Synthesen im Tierkörper. 2. Mitteilung. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **45**. S. 119 (1901).

[2]) *C. Neuberg* und *W. Neimann*, Synthese gepaarter Glykuronsäuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **44**. S. 114 (1905).

[3]) *H. Hildebrandt*, Zur Frage der glykosidischen Struktur gepaarter Glykuronsäuren. Beitr. z. chem. Physiol. Bd. 7. S. 438 (1905). — *M. Kauffmann*, Stoffwechseluntersuchungen bei Alkoholdeliranten. Journ. f. Psych. u. Neurol. Bd. 10. S. 46 (1907). — *J. Hämäläinen*, Über isomere Borneolglykuronsäuren. Skandinavisches Arch. f. Physiol. Bd. **23**. S. 96 (1909).

der Paarling reduzierende Eigenschaften haben kann. Einzelne gepaarte Glykuronsäuren werden erst durch Ammoniakzusatz als Bleisalz gefällt. Auftreten von Reduktion der *Fehling*schen Lösung beim Kochen spricht für Anwesenheit von freier Glykuronsäure namentlich dann, wenn die vom Bleisulfat abfiltrierte Flüssigkeit ohne vorheriges Kochen keine reduzierenden Eigenschaften besitzt. Nun sind freilich namentlich in der neueren Zeit mehrere gepaarte Glykuronsäuren beobachtet worden, welche in den basischen Bleiniederschlag übergehen und direkt *Fehling*sche Lösung reduzieren; hier kann man unter Umständen zu einer sicheren Entscheidung kommen, wenn man eine Linksdrehung der unzersetzten Lösung konstatieren kann, welche nach der Spaltung in eine Rechtsdrehung übergeht. Dabei kann es nun vorkommen, daß einmal die Drehungsrichtung von Glykuronsäure und Paarling entgegengesetzt sind und scheinbare Inaktivität zeigen. Ferner kann es sich ereignen, daß beide Komponenten die Ebene des Polarisationslichtes im gleichen Sinn ablenken und so eine Rechtsdrehung beobachtet wird, die eventuell lediglich von den Eigenschaften des Paarlings herrührt. Es kann auch vorkommen, daß die gepaarte Verbindung eine deutliche Rechtsdrehung zeigt, die aber lediglich bedingt sein kann durch die rechtsdrehende Eigenschaft des Paarlings. Da nun die Menge der gepaarten Verbindung nicht bekannt ist, so läßt sich keine etwaige Verminderung der Drehungsintensität des Paarlings durch die angefügte Glykuronsäure feststellen, wohl aber nachdem die gepaarte Verbindung isoliert worden ist. Da nun die Isolierung der gepaarten Verbindung nicht in allen Fällen gelingt, so ist der Nachweis der Spaltungsprodukte von besonderer Wichtigkeit. Bei der Isolierung des eingeführten Paarlings kann indessen eine derartige Veränderung stattfinden, daß kein brauchbares Produkt isoliert werden kann. Es ist in einigen Fällen die Zinkstaubdestillation angewendet worden, um das im Organismus erzeugte Oxydationsprodukt zu dem weniger empfindlichen ursprünglichen Körper zu reduzieren. Viel rationeller erscheint es (*P. Mayer* und *C. Neuberg*[1]), den allen gepaarten Glykuronsäuren gemeinsamen Paarling, die Glykuronsäure, selber nachzuweisen.

Was die Orcinsalzsäurereaktion betrifft, so kann sie bei sehr leicht spaltbaren Glykuronsäuren schon vor dem Erhitzen der Flüssigkeit positiv ausfallen und ist außerdem von einer solchen Empfindlichkeit, daß die Stärke ihres Ausfalls keinen Schluß auf die wirklich vorhandene Menge der Glykuronsäure gestattet. Man spaltet die auf Gegenwart gepaarter Verbindungen zu untersuchende Flüssigkeit, mit 1%iger Schwefelsäure unter Druck, neutralisiert die abgekühlte Flüssigkeit durch Natriumkarbonat und setzt am besten p-Bromphenylhydrazinchlorhydrat und die entsprechende Menge Natriumacetat hinzu; nach etwa 10 Minuten langem Erwärmen pflegt die Kristallabscheidung zu beginnen. Man unterbricht dann die Erwärmung und filtriert sofort durch ein bereit gehaltenes Faltenfilter. Beim Erkalten

[1] Über den Nachweis gepaarter Glykuronsäuren und ihr Vorkommen im normalen Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29. S. 256 (1900).

erfolgt reichliche Kristallisation. Der entstandene hellgelbe Niederschlag wird an der Saugpumpe abfiltriert, die Mutterlauge von neuem im Wasserbade erhitzt, beim Beginn der Kristallabscheidung abermals filtriert, auf der Nutsche abgesaugt usw. Dieses Verfahren wird so oft wiederholt, als erneutes Erhitzen weitere Niederschlagsbildung bewirkt. Die gesammelte Hydrazinverbindung wird dann gründlich mit heißem Wasser und absolutem Alkohol gewaschen; sie schmilzt nach dem Umkristallisieren aus 60%igem Alkohol bei 236°. Löst man 0·2 *g* dieser Verbindung in 1·0 *cm*³ gereinigten Pyridins und 6·0 *cm*³ absoluten Alkohols, so erhält man im *Laurent*schen Halbschattenapparat bei Natriumlicht den Ablenkungswinkel von —7° 25′. Hieraus und aus dem spezifischen Gewicht der Lösung von 0·886 ergibt sich $[\alpha]_D^{20} = -369°$. Das optische Verhalten dieser Verbindung ermöglicht eine leichte und sichere Erkennung der Glykuronsäure.[1])

Die neuerdings von *B.* und *C. Tollens*[2]) angegebene Reaktion mit Naphtoresorcin sollte eine direkte unzweideutige Entscheidung ermöglichen, ob gepaarte Glykuronsäure vorhanden ist.

Zu 5 *cm*³ Urin fügt man 0·5 *cm*³ einer 1%igen alkoholischen Naphtoresorcinlösung und 5 *cm*³ konzentrierte Salzsäure. Dann erwärmt man über der Flamme bis zum Kochen und setzt das Kochen über ganz kleiner Flamme noch eine Minute fort. 4 Minuten läßt man die Flüssigkeit nun ruhig stehen, dann kühlt man das Probierrohr unter dem fließenden Wasser der Leitung gut ab. Darauf wird nach Zusatz vom gleichen Volumen Äther energisch geschüttelt und wiederum gewartet, bis sich der Äther klar absetzt. Die Klärung der Ätherschicht kann man durch Zusatz einiger Tropfen Alkohol beträchtlich beschleunigen. Ist Glykuronsäure im Urin enthalten, so ist die Ätherschicht je nach der Menge schön blau — bei geringerem Glykuronsäuregehalt — violett und zeigt vor dem Spektralapparat ein deutliches Band in der Gegend der Natriumlinie. Die Reaktion ermöglicht die bisher schwierige Unterscheidung der Glykuronsäure und Pentosen im Urin. Aus der Intensität der Färbung der Ätherschicht wird man auf einen größeren oder geringeren Gehalt an Glykuronsäure schließen können. Die bei der Reaktion entstehende blaue Substanz ist in Äther löslich, während die von Arabinose und Xylose sowie von den übrigen Zuckerarten gelieferten Stoffe diese Eigenschaft nicht besitzen.

Nach den Beobachtungen von *C. Neuberg* und *Mandel*[3]) ist die Orcinreaktion durchaus nicht weniger empfindlich, als die neu angegebene mit

---

[1]) *C. Neuberg,* Über eine Verbindung der Glykuronsäure mit p-Bromphenylhydrazin. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **32**. S. 2395 (1899). — *C. Neuberg,* Über die Reinigung der Osazone und zur Bestimmung ihrer optischen Drehungsrichtung. Ebenda. S. 3384.

[2]) *C. Tollens,* Der Nachweis von Glykuronsäure nach *B. Tollens* im menschlichen Urine. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **56**. S. 115 (1908); Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **41**. S. 1788 (1908). — *C. Tollens,* Quantitative Bestimmung der Glykuronsäure im Urin mit der Furfurol-Salzsäuredestillationsmethode. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **61**. S. 95 (1909).

[3]) *C. Neuberg* und *J. A. Mandel,* Naphtoresorcin als Reagens auf einige Aldehyd- und Ketosäuren. Biochem. Zeitschr. Bd. **13**. S. 148 (1908).

Naphtoresorcin, und doch wird mit letzterer häufiger ein positives Resultat erhalten. Der Grund liegt darin, daß Naphtoresorcin auch mit anderen Stoffen jene Reaktion gibt, deren natürliches Vorkommen im Harn sich nicht ausschließen läßt. Hiernach wird die Naphtoresorcinreaktion nicht mehr als unbedingt für die Glykuronsäure beweisend zu betrachten sein.

Wiederholt ist die Erfahrung gemacht worden, daß im Harn Substanzen enthalten sind, welche eine in wässerigen Medien glatt verlaufende Reaktion stören. Die für die Reduktion von Chloraten gut verwendbare salpetrige Säure kommt im Harn nicht vollständig zur Wirkung, da sie zum Teil durch Reaktion mit dem Harnstoff verbraucht wird[1]); man muß hier eine erheblich größere Menge salpetrige Säure anwenden, um alles Chlorat zu reduzieren. Das Tempo, in dem die Nitritabsorption durch den Harnstoff verläuft, ist ein verhältnismäßig langsames, so daß leicht diazotierbare aromatische Verbindungen[2]), welche im Harn vorhanden sind, durch zugesetztes Nitrit zuvor in die Nitroso-Verbindungen übergehen, ehe der Harnstoff an die Reihe kommt, und es ist möglich, das Ende der Titration mit Nitrit am Beginn der Bläuung des Jodkalistärkepapiers zu erkennen; bei wiederholten Tüpfelversuchen nimmt das Vermögen einer zu Ende titrierten Harnprobe, das Papier zu bläuen, nur ganz allmählich ab.

Versetzt man einen Jodide enthaltenden Harn mit Palladiumchlorürlösung, so erhält man eine Ausscheidung, aus der sich erheblich mehr Halogen berechnet, als im Harn enthalten ist, da bei der Ausscheidung des Palladiumjodürs noch Verbindungen des Palladiums mit organischen Substanzen mitgerissen werden, welche an und für sich nicht gefällt werden.[3]) Es ist daher notwendig, den Niederschlag im Tiegel mit Soda zu glühen, wodurch das im Niederschlage enthaltene Palladiumjodür vollständig zerlegt und alles Jod an Natrium gebunden wird. Der Rückstand wird mit heißem Wasser ausgelaugt und von neuem mit Palladiumchlorür gefällt, der Niederschlag auf einem gewogenen Filter gesammelt, ausgewaschen, getrocknet und gewogen.

Nachdem *E. Salkowski*[4]) gefunden hatte, daß aus Zucker bei Gegenwart von Mineralsäuren bei der Destillation jodbindende Substanzen übergehen, stellte *C. Neuberg*[5]) fest, daß die beim Diabetes gefundenen hohen Phenolwerte auf dieser Quelle beruhen. Nach *L. Borchardt*[6]) läßt sich bei der quantitativen Acetonbestimmung im diabetischen Harne eine Ab-

[1]) *H. Hildebrandt*, Zum Nachweis von Chloraten im Harn. Vierteljahresschr. f. gerichtl. Med. Bd. **32**. S. 80 (1906).

[2]) *H. Dreser*, Zur Kenntnis des Maretins. Med. Klinik. Nr. 44. S. 1684 (1908).

[3]) *E. Harnack*, Über die Methoden der quantitativen Jodbestimmung im menschlichen Harne. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8. S. 158 (1883).

[4]) Über die Untersuchung des Harns auf Aceton. *Pflügers* Arch. Bd. **56**. S. 339 (1894).

[5]) Über die quantitative Bestimmung des Phenols im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **27**. S. 123 (1899).

[6]) *L. Borchardt*, Über Fehlerquellen bei der Bestimmung des Acetons im Harn. Beitr. z. chem. Physiol. Bd. **8**. S. 62 (1906)

spaltung von Ketonen nicht ganz vermeiden, da besondere Versuche lehrten, daß mit zunehmender Zuckermenge die Menge der abgespaltenen Ketone zunimmt, die gleichfalls Jodoform bilden, also zu hohe Werte vortäuschen.

Die *Zeisel-Fanto*sche Methode der Glyzerinbestimmung beruht darauf, daß Glyzerin unter der Einwirkung kochender wässeriger Jodwasserstoffsäure in flüchtiges Jodäthyl verwandelt wird, dessen Dampf von begleitendem Jod und Jodwasserstoff befreit in alkoholische Silberlösung eintritt, mit welcher es sich zu Jodsilber umsetzt, welches gewogen wird. Aber auch in dem Harn von Personen, welche kein Glyzerin erhalten, können bei der Durchführung des Jodidverfahrens kleine Mengen Silberjodids auftreten.[1] Bei ganz genauen Bestimmungen ist die Menge dieses Silberjodidniederschlages in dem Harne des der Glyzerindarreichung vorangehenden Tages zu bestimmen und von der Menge des im Glyzerintage erhaltenen Silberjodids abzuziehen. Wenn auch aus dem Harne die Sulfatschwefelsäure durch Chlorbarium entfernt worden war, so trat doch bei der Behandlung des sulfatfreien Harns mit kochender Jodwasserstoffsäure Schwefelwasserstoff auf, wie sich leicht an einer mehr oder weniger starken Schwärzung einer an Stelle des Silbers vorgelegten Bleiacetatlösung erkennen ließ. Bei dem regelrecht durchgeführten Jodidverfahren erzeugte der mit etwas Schwefelwasserstoff gemengte Isopropyljodiddampf in der Silberlösung neben Jodsilber auch den schwarzen Niederschlag von Schwefelsilber. Der $SH_2$ bildet sich beim Kochen des Harns mit JH durch Reduktion der nach Ausfällung mit Chlorbarium darin noch verbleibenden schwefelhaltigen Verbindungen; je nach deren Menge kann das Schwefelsilber unter Umständen eine genaue Bestimmung des gebildeten Jodsilbers vereiteln. Diese Störung wird vermieden, wenn man den $SH_2$-haltigen Isopropyljodiddampf durch eine kleine, mit etwa 5 *cm*³ einer 5%igen Natriumarseniatlösung beschickte Peligot-Röhre leitet.

Schließlich ist besonders zu betonen, daß die Stoffwechselprodukte einer in den Organismus eingeführten Substanz je nach der Art der Einverleibung verschieden sein können. Die Orthophtalsäure[2] wird bei subkutaner Injektion vollständig wieder ausgeschieden, bei innerlicher Darreichung infolge der Fäulnisvorgänge zum großen Teil zerstört.

## B. Spezieller Teil.

Nur in einigen Fällen ist es möglich, das nach Darreichung einer bestimmten Substanz im Organismus entstehende Stoffwechselprodukt ohne jede Bearbeitung des Harnes zu fassen.

Wenn man an Kaninchen, die durch Haferfütterung sauren Harn lassen, die Basen: para- und ortho-Thymotin-piperidid[3] dar-

[1]) *A. Herrmann,* Über die Bestimmung des Glyzerins im Harn. Beitr. z. chem. Physiol. Bd. 5. S. 422 (1904).

[2]) *J. Pohl,* Verhalten der Phtalsäure im Organismus. Biochem. Zeitschr. Bd. 16. S. 68 (1909).

[3]) *H. Hildebrandt,* Über einige Synthesen im Tierkörper. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 44. S. 279 (1900).

reicht, so scheidet sich im spontan gelassenen Harn das Stoffwechselprodukt direkt aus: es handelt sich dabei um eine Anlagerung von Glykuronsäure und gleichzeitige Methylierung am Stickstoff. Auch nach Darreichung von Thymotinalkoholpiperidid[1]) scheidet sich das Stoffwechselprodukt direkt im Harn, wenn auch in anderer Form aus: hier ist die Alkoholgruppe zur Carboxylgruppe oxydiert worden und an das Phenolhydroxyl hat sich ebenfalls Glykuronsäure angelagert.

Nach Einnahme von Tellurverbindungen zeigt die Atemluft einen Knoblauchgeruch: Tellurmethyl.[2]) Die beim Durchleiten von Tellurmethyl durch Jodjodkaliumlösung entstandene Methylverbindung kann durch Überführung in das aromatisch riechende Schwefelmethyl $(CH_3)_2S$ erkannt werden. Es genügt, die Jodlösung alkalisch zu machen und mit Schwefelnatriumlösung zu erwärmen. Nach selenigsaurem Natrium bildet sich Selenmethyl im Organismus.

Reicht man unseren gewöhnlichen Versuchstieren (Hunden, Katzen, Kaninchen) per os, subkutan oder intravenös eine genügende Menge von Thioharnstoff (1—2 *g*), so nimmt das Exhalat allmählich einen eigentümlichen rettich- oder lauchartigen Geruch an, der stunden- ja tagelang andauert: Alkylsulfid $(C_2H_5)_2S$.[3])

Nach Darreichung von Chinosol (Gemenge von o-Oxychinolinsulfat mit Kaliumsulfat) scheiden sich bisweilen im Harn von Kaninchen spontan grünlich-weiße Kristalle[4]) aus von einer Größe bis zu $^1/_2$ *cm*, und zwar stets, wenn der Harn infolge wasserarmer und „saurer" Nahrung von vornherein sauer und konzentriert war. Der frische Harn wurde direkt mit neutralem und das Filtrat mit basischem Bleiacetat gefällt. Dieser letztere Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt, aus der mit Tierkohle entfärbten Flüssigkeit schieden sich beim Erkalten große, wasserhelle Kristalle aus, die sich als identisch mit den spontan ausgefallenen erwiesen. Aus Kaninchen- und Hundeharn wurde ganz die gleiche Substanz erhalten. Das Kalisalz der Säure wurde aus dem Barytsalz erhalten durch Umlegen mit Kaliumsulfat: o-Oxychinolinglykuronsäure.

Der nach Darreichung von Chloralacetophenon: $CCl_3CHOH.CH_2.CO.C_6H_5$ von Kaninchen gelassene Harn enthielt ziemlich zahlreiche mikroskopisch als Blättchen und Nadeln erkennbare Kriställchen[5]), deren Menge beim Stehen des Harns sich noch vermehrte. Dieselben wurden auf

[1]) *H. Hildebrandt*, Pharmakol. Stud. über synth. hergestellte Basen aus der Piperidinreihe. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53. S. 249 (1904).

[2]) *Fr. Hofmeister*, Über Methylierung im Tierkörper. Arch. f. exp. Pharm. Bd. **33**. S. 198 (1894).

[3]) *J. Pohl*, Über eine Alkylsynthese nach Thioharnstoffaufnahme. Arch. f. exper. Pharm. Bd. **51**. S. 341 (1904).

[4]) *C. Brahm*, Über das Chinosol, sein Verhalten im Tierkörper und über die Bildung gepaarter Glykuronsäuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **28**. S. 439 (1899).

[5]) *H. Tappeiner*, Über das Verhalten einiger Kondensationsprodukte des Chlorals mit Ketonen im Tierkörper. Arch. f. exp. Pharm. Bd. **33**. S. 364 (1894).

der Saugpumpe abfiltriert und mit wenig Wasser gewaschen, der Filterrückstand wurde mit kochendem heißen absoluten Alkohol ausgezogen, der Alkohol verjagt und der Rückstand in Äther gelöst. Nach dem Verdunsten desselben blieben zum Teil schon gut ausgebildete Prismen zurück, der ölige Anteil, mit heißem Ligroin behandelt, liefert weitere Mengen von Trichloräthyliden-acetophenon: $CCl_3 . CH : CH . CO . C_6H_5$, Sp. 102°, welches auch durch Einwirkung konzentrierter Schwefelsäure aus dem zur Fütterung benutzten Körper entsteht unter Austritt von Wasser.

Nach Darreichung von Dimethylaminoparaxanthin[1]) (Paraxin) fiel aus dem Urin der meisten Patienten bei vorhandener saurer Reaktion verschieden reichlich ein Niederschlag glitzernder Kristalle aus. Durch Abzentrifugieren und nochmaliges Umkristallisieren, durch schwaches Ansäuern mit Essigsäure wurde die Substanz völlig rein erhalten und bildete eine atlasglänzende Masse, Sp. 319°. Sie ist entstanden durch Verlust der 4-Methylgruppe des Paraxins in der 1-Stellung (Dimethylaminoheteroxanthin).

Nach Darreichung von Benzidin am Kaninchen wird ein Harn gelassen, welcher spontan ein Sediment in der Kälte absetzt[2]), dieses wird mit Alkohol in der Wärme aufgenommen und filtriert, worauf eine Ausscheidung erfolgt. Das gelbbraune alkoholische Filtrat wird zu einem großen Teile abdestilliert, der Rest des Alkohols auf dem Wasserbad verjagt. Es resultiert eine dunkle, beim Erkalten erstarrende Masse; diese wird nun mit Wasser gut verrieben und heiß filtriert: Beim Abkühlen erstarrt die Lösung zu einem dichten Kristallbrei: 4.4'-Diaminodioxydiphenyl, Sp. 135—138°.

Die nach Darreichung von Carvacrylpiperidid[3]) vom Kaninchen im Harn ausgeschiedene Verbindung wird dadurch gewonnen, daß der zur Trockene eingedampfte Harn mit 90%igem Alkohol ausgekocht und der Verdunstungsrückstand mit heißem Wasser aufgenommen, mit Tierkohle behandelt und heiß filtriert wird; nach längerem Stehen scheiden sich Kristalle aus vom Sp. 210°, die das Umwandlungsprodukt der Verbindung darstellen, welches durch die Anlagerung der Glykuronsäure entsteht.

## Ätherschwefelsäuren.

Aus dem Pferdeharn, der die „phenolbildende Substanz" in besonders großer Menge enthält, gelang es *E. Baumann*[4]), sie in kristallinischem Zustande abzuscheiden. Pferdeharn wird zum Sirup verdunstet, mit 80%igem Alkohol aufgenommen, nach Abdestillieren des Alkohols wird

---

[1]) *J. Forschbach* und *S. Weber*, Das Dimethylaminoparaxanthin, seine diuretische Wirksamkeit und sein Abbau im Organismus des Menschen. Arch. f. exp. Pharm. Bd. 56. S. 186 (1907).

[2]) *O. Adler*, Die Wirkung und das Schicksal des Benzidins im Tierkörper. Arch. f. exp. Pharm. Bd. 58. S. 167 (1908).

[3]) *H. Hildebrandt*, Über einige Synthesen im Tierkörper. Arch. f. exper. Pharm. Bd. 44. S. 297 (1900).

[4]) Über Sulfosäuren im Harn. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 9. S. 54 (1876).

wieder zum dünnen Sirup verdunstet, den man in der Kälte stehen läßt; nach ein oder mehreren Tagen bilden sich reichliche Kristalle in demselben, die nach etlichen Tagen abfiltriert werden. Man erhält so einen braunen Kristallbrei, der durch Absaugen mit der Pumpe und zuletzt Pressen zwischen Filtrierpapier von der Mutterlauge möglichst befreit wird; durch wiederholtes Umkristallisieren aus Wasser und zuletzt aus Alkohol erhält man blendendweiße perlmutterglänzende Tafeln, welche die „phenolbildende Substanz" des Harns darstellen.

Aus dem Harn von Menschen oder Hunden, welche mit Phenol behandelt wurden, wird das phenylschwefelsaure Kalium in folgender Weise rein erhalten[1]): Der zum Sirup eingedampfte Harn wird mit 90%igem Alkohol aufgenommen, mit einer alkoholischen Lösung von Oxalsäure, so lange ein Niederschlag entsteht, gefällt, hierauf mit dem gleichen Volumen Äther versetzt und geschüttelt. Nach einiger Zeit wird abfiltriert, mit Pottaschelösung neutralisiert und auf ein kleines Volumen verdunstet. Durch nochmaliges Aufnehmen mit Alkohol wird etwa gelöstes oxalsaures oder kohlensaures Kali abgeschieden. Das Filtrat läßt beim Stehen dieselben Kristalle abscheiden, welche aus Pferdeharn erhalten wurden. Aus der ersten braunen Mutterlauge können noch mehr von diesen Kristallen erhalten werden, wenn man ihre Lösung mit Bleiessig fällt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und wieder zum Sirup eindunstet. Häufig erstarrt dieser beim Stehen zu einem Brei von Kristallblättchen. Noch bessere Ausbeute erhält man, wenn man den Sirup mit gewöhnlichem Äther wiederholt schüttelt und einige Zeit stehen läßt; es schlämmen sich dann in dem Äther eine Menge kleiner Kristalle auf, die nach dem Abfiltrieren durch einmaliges Umkristallisieren rein erhalten werden.

Zur Darstellung der Ätherschwefelsäure des Acetanilids[2]) wurde der Harn zum Sirup eingedampft, mit Weingeist von 90–93% ausgezogen, mit $^1/_2$ Volumen Äther und mit einer während einer längeren Zeit erwärmten konzentrierten alkoholischen Oxalsäurelösung versetzt; die Lösung wurde von dem Niederschlage abgehoben, durch Kaliumkarbonatlösung neutralisiert und auf dem Dampfbade eingetrocknet. Aus dem Rückstande wurde unter gelindem Erwärmen der rückständige Harnstoff und ein Teil des überschüssigen Kaliumäthyloxalates durch Weingeist extrahiert und schließlich das Kaliumsalz durch Kochen mit Weingeist gelöst und siedendheiß filtriert; es schied sich die Doppelverbindung des ätherschwefelsauren Kaliums mit dem Kaliumäthyloxalat aus:

$$C_6H_4 \begin{cases} NH.C_2H_3O \\ O.SO_2.OK \end{cases} + \begin{cases} CO.O.C_2H_5 \\ CO.O.K. \end{cases}$$

[1]) *E. Baumann*, Über die Ätherschwefelsäuren der Phenole. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **2**. S. 335 (1878).

[2]) *K. A. H. Mörner*, Stoffwechselprodukte des Acetanilids im menschlichen Körper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **13**. S. 12 (1889).

Das Eintreten von Indikanurie nach subkutaner Injektion von Oxalsäure[1]) hängt möglicherweise mit der leichten Entstehung des entsprechenden Doppelsalzes mit der Indoxylschwefelsäure im Organismus zusammen.

Der Harn eines Hundes, welcher eine Woche lang täglich 1—2 *g* reines p-Kresol[2]) innerlich erhielt, wurde eingedampft, mit starker Salzsäure angesäuert, erwärmt und nach dem Erkalten mit Äther extrahiert. Dem Ätherextrakt wurden durch Schütteln mit Sodalösung die darin enthaltenen Säuren entzogen, die alkalisch-wässerige Lösung wurde von neuem angesäuert und mit Äther erschöpft, der Ätherauszug hinterließ beim Verdunsten einen kristallinischen Rückstand, der in Wasser gelöst, entfärbt und durch Umkristallisieren gereinigt wurde. Er erwies sich als Paraoxybenzoesäure, Sp. 209°. Nach Darreichung von o-Kresol konnte das analoge Oxydationsprodukt nicht erhalten werden. Dagegen enthielt der ätherische Auszug des mit Salzsäure erwärmten Harns, welcher mit Natriumkarbonat zur Entfernung der Säuren geschüttelt war, eine Substanz mit den Eigenschaften des Hydrochinons.[3]) Die wässerige Lösung wurde durch vorsichtige Fällung mit Bleiacetat entfärbt und nach Entfernung des Bleies und Ansäuern wieder mit Äther ausgeschüttelt. Der Rückstand dieses Ätherauszuges erstarrte beim Erkalten kristallinisch: Hydrotoluchinon, Sp. 121·5°. Nach Darreichung von m-Kresol, welches ebenfalls Hydrotoluchinon liefern konnte, wurden nur Ätherschwefelsäuren nachgewiesen.

Um den Paarling der nach Vanillineinfuhr[4]) neugebildeten Ätherschwefelsäure zu gewinnen, wurde der Harn mit Salzsäure auf dem Wasserbade erwärmt und mit Äther ausgeschüttelt. Der Äther hinterließ eine sirupöse Flüssigkeit, welche, mit kohlensaurem Natron neutralisiert, nochmals mit Äther behandelt wurde. Nach dem Verdunsten desselben wurde ein nach Vanillin riechender Rückstand gewonnen, aus welchem jedoch wegen der geringen Menge die Darstellung des Vanillins in Kristallen nicht gelang. Nunmehr wurde die vom Äther getrennte alkalische Flüssigkeit mit Schwefelsäure versetzt und mit Äther wiederholt geschüttelt. Vom Äther wurde eine Säure aufgenommen, welche, durch öfteres Umkristallisieren aus Wasser und durch Waschen mit wenig Äther gereinigt, in Form weißer Nadeln, denen noch eine Spur von Harnstoff anhing, erhalten wurde: Vanillinsäure, Sp. 205°. Spätere Untersuchungen haben gezeigt, daß Vanillin im Tierkörper außer der Paarung mit Schwefelsäure auch

---

[1]) *E. Harnack* und *von der Leyen*, *H. Hildebrandt*, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 205 (1900) bzw. Bd. **35**. S. 141 (1902).

[2]) *E. Baumann*, Über die Entstehung des Phenols im Tierkörper und bei der Fäulnis. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **3**. S. 250 (1879).

[3]) *C. Preusse*, Zur Kenntnis der Oxydation aromatischer Substanzen im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **5**. S. 57 (1881).

[4]) *C. Preusse*, Über das Verhalten des Vanillins im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **4**. S. 209 (1880).

eine solche mit Glykuronsäure eingeht, so daß ein Teil der als Spaltungsprodukt gewonnenen Vanillinsäure durch die Spaltung der Glykuronsäureverbindung erhalten wurde.

## Glykokollpaarlinge.

Der nach Darreichung von p-Cymol[1]) vom Hunde gelassene Harn wurde schwach alkalisch gemacht, auf $^1/_{10}$ seines Volumens verdunstet, mit Salzsäure übersättigt und mit großen Mengen Äther ausgeschüttelt so lange, bis dieser nichts mehr aufnahm. Von der ätherischen Flüssigkeit wurde der größte Teil des Äthers abdestilliert, der Rest wiederholt mit Sodalösung ausgeschüttelt, von der alkalischen Flüssigkeit der Äther abgehoben, der letzte Rest desselben durch Erwärmen verjagt und die Flüssigkeit mit überschüssiger Salzsäure versetzt. Es schied sich sofort in sehr reichlicher Menge eine kristallinische, nur sehr wenig gefärbte Säure ab; nach nochmaligem Umlösen wird die Säure durch Kochen mit kohlensaurem Barium gelöst und aus der heißen Lösung nunmehr völlig farblos gefällt. Alsdann wurde sie in ihr Calciumsalz verwandelt und aus diesem durch Umkristallisieren gereinigten Salz wieder abgeschieden. Sp. 168°. Cuminursäure $C_{12}H_{15}NO_3$.

Sie ist in heißem Wasser löslich und kristallisiert daraus beim langsamen Erkalten in großen irisierenden rhombischen Blättern, die kein Kristallwasser enthalten; aus den Lösungen ihrer Salze wird sie durch Säuren in perlmutterglänzenden Schuppen gefällt. Wird im zugeschmolzenen Rohr 2 Stunden mit konzentrierter Salzsäure auf 120—125° erhitzt, so wird eine Spaltung herbeigeführt. Der Röhreninhalt wird wiederholt mit Äther ausgeschüttelt, der wässerige Rückstand hinterläßt beim Verdunsten salzsaures Glykokoll, welches zur sicheren Erkennung in Glykokoll-Kupfer übergeführt wird. Aus den Ätherauszügen wurde durch kohlensaures Natron die entstandene stickstofffreie Säure aufgenommen und durch Salzsäure gefällt. Sp. 115°. Zur vollständigen Reinigung wurde sie in ihr ziemlich schwer lösliches, sehr gut in seidenglänzenden Nadeln kristallisierendes Calciumsalz verwandelt, dieses umkristallisiert und wieder durch Salzsäure zersetzt, Sp. 116·5°. Mit Wasserdämpfen ließ sich die Säure leicht verflüchtigen; die so destillierte Säure zeigte denselben Schmelzpunkt.

Die Cuminursäure zersetzt sich bei der Destillation mit Salzsäure nicht, so daß keine Cuminsäure übergeht.

Im Organismus des Kaninchens scheint sich aus p-Cymol vorwiegend freie Cuminsäure zu bilden, da der nach Darreichung von p-Cymol unter Zusatz von Salzsäure destillierte Harn ein Destillat ergibt, in welchem sich Cuminsäure ausscheidet.

Allerdings hatte *Ziegler*[2]) bereits früher mit dem von *Jacobsen* angewandten Verfahren reine Cuminsäure aus dem Harn des Hundes

[1]) *O. Jacobsen*, Über das Verhalten des Cymols im Tierkörper. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Bd. **12**. S. 1512 (1879).

[2]) *E. Ziegler*, Über das Verhalten des Kampfercymols im tierischen Organismus. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **1**. S. 65 (1873).

erhalten, wobei eine etwaige Bildung aus präformierter Cuminursäure nicht anzunehmen ist. Der Harn wurde eingedampft, mit Alkohol extrahiert, der Auszug verdunstet, dann mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Der abdestillierte Äther hinterließ ein braunes, auf dem Wasser schwimmendes Öl, welches erst nach sehr langem Stehen sich auf den Grund des Gefäßes senkte und zu langen Nadeln erstarrte. Zur Reinigung der Säure wurde mit Bariumkarbonat unter Zusatz von Tierkohle gekocht und das Filtrat mit Salzsäure versetzt, sodann wurde die Säure mehrmals aus heißem Wasser umkristallisiert.

Vollständig gereinigt kristallisiert sie aus wässeriger Lösung in langen, feinen, seideglänzenden, weißen Nadeln, welche unter dem Mikroskop als rhombische Säulen erscheinen: Cuminsäure, Sp. 115°.

Bei der Verarbeitung des Harns, wobei der angesäuerte Harn mit Äther ausgeschüttelt wird, macht sich häufig der Übelstand bemerkbar, daß die ganze Flüssigkeit in eine dicke Emulsion verwandelt wird. Es ist zweckmäßig, erst den Harn einzudampfen und den Rückstand mit absolutem Alkohol zu fällen. Zur Isolierung der nach Darreichung von Salizylsäure entstandenen Salizylursäure[1]) empfiehlt sich ein Gemisch von Äther und Benzol, welches sowohl die Salizylsäure als die Salizylursäure aufnimmt; beim Erkalten der wässerigen Flüssigkeit, welche ein Gemenge beider enthält, kristallisiert die Salizylursäure zuerst: Sp. 171—172°; sie ist identisch mit der von *S. Bondi*[2]) synthetisch durch Kuppelung des Säureacid mit Glykokoll dargestellten.

*U. Mosso*[3]) hat das Bleiverfahren zur Gewinnung der Stoffwechselprodukte der Salizylsäure verwandt: Wird der Harn mit Bleiessig und Ammoniak ausgefällt, so findet sich im Filtrate die ganze Menge der im Harn vorkommenden Hippursäure, welche durch Bleiessig und Ammoniak weder bei gewöhnlicher Temperatur noch beim Erhitzen gefällt wird. Die Bleiniederschläge enthalten die Salizylsäure und die Salizylursäure, werden mit Schwefelsäure oder Ammoniumkarbonat zerlegt, die Lösung von dem Bleisulfat oder Bleikarbonat abfiltriert und der Niederschlag so lange ausgewaschen, bis das Filtrat mit Eisenchlorid keine Violettfärbung mehr zeigt. Aus der erhaltenen Lösung gewinnt man die Salizylsäure und Salizylursäure durch Ausschütteln mit Äther und Essigäther. Der Äther wird in Glasschalen bei gelinder Temperatur verdunstet, der Rückstand in Wasser gelöst und die Lösung auf dem Wasserbad verdunstet, wobei die mit Wasserdämpfen leicht flüchtige Salizylsäure entfernt wird, während Salizylursäure zurückbleibt.

---

[1]) *Piccard* und *Beck*, Über Salizylursäure. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 8. S. 817 (1875).

[2]) *S. Bondi*, Synthese der Salizylursäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 52. S. 170 (1907).

[3]) *U. Mosso*, l. c. S. 270.

Zur quantitativen Bestimmung der Salizylsäure wird der Harn bei alkalischer Reaktion[1]) (Zusatz von einigen Stückchen Natriumhydrat) bis zur Sirupkonsistenz eingedampft, der Rückstand vielmals mit absolutem Alkohol extrahiert, der Alkohol aus dem Extrakt möglichst vollkommen entfernt, das Zurückgebliebene in Wasser gelöst, die Lösung mit Schwefelsäure angesäuert und mit Essigäther extrahiert. Der aus dem Essigätherextrakt gewonnene Rückstand wird nun in wenig Wasser gelöst, die Lösung mit verdünnter Salzsäure versetzt und in einem Kölbchen mit Rückflußrohr 6 Stunden lang auf dem Wasserbad erwärmt. Diese Lösung wurde wieder mit Äther extrahiert, der Ätherrückstand in ammoniakhaltigem Wasser gelöst und unter Zusatz von Ammoniak mit Bleiessig gefällt. Der Bleiniederschlag wurde auf dem Filter ausgewaschen, durch mehrstündiges Erwärmen mit einer Sodalösung zerlegt, vom Bleikarbonat wurde filtriert, ausgewaschen, bis das Waschwasser keine Salizylsäurereaktion mehr gab, das Filtrat eingeengt, mit Schwefelsäure angesäuert und noch einer dritten Extraktion mit Äther unterworfen. Dieser Extrakt lieferte die reine Salizylsäure, welche bei 50—55° getrocknet wurde.

Der nach Darreichung von Piperonal[2]) vom Kaninchen gelassene Harn wurde zur Sirupdicke eingedampft, mit Alkohol extrahiert und der filtrierte alkoholische Auszug nach dem Abdestillieren des Alkohols mit Salzsäure angesäuert. Es trat sofort eine starke Trübung auf und nach einigem Stehen hatte sich eine reichliche Menge von warzenförmigen Kristallen abgeschieden, die durch Auflösen in Ammoniak, Behandeln der Lösung mit Tierkohle und nachherigem Ausfällen mit Säure gereinigt wurden: Piperonylsäure, Sp. 227°. Nach Safrol, das zum größten Teil in Dampfform unverändert durch die Lungen ausgeschieden wird, waren nur kleine Mengen Piperonylsäure im Harn zu finden: Oxydation der Allylseitenkette $CH_2 . CH = CH_2$ zu Carboxyl.

Bei Verarbeitung des Menschenharns fand sich neben der Piperonylsäure eine in Äther unlösliche, die aus Wasser umkristallisiert wurde: Piperonylursäure, Sp. 178°.

Die nach Darreichung von α-Picolin[3]) erhaltenen Harne wurden zur Trockene eingedampft und mit kochendem Alkohol dreimal extrahiert, die vereinigten Auszüge nach dem Klären filtriert und abgedampft, der Rückstand in wenig Wasser gelöst, zunächst mit verdünnter Essigsäure angesäuert und viermal mit erneuten größeren Portionen Äther extrahiert. Nach dem Abdestillieren blieb ein dunkelgefärbter Rückstand, der nach völligem Verdunsten des Äthers zunächst nicht kristallinisch wurde, sondern erst nach Wochen. Die essigsaure Lösung wurde mit Schwefelsäure versetzt

[1]) *St. Bondzynski*, Über das Verhalten einiger Salizylsäureester im Organismus. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **38**. S. 88 (1897).

[2]) *A. Heffter*, Zur Pharmakologie der Safrolgruppe. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **35**. S. 342 (1895).

[3]) *R. Cohn*, Über das Verhalten einiger Pyridin- und Naphtalinderivate im tierischen Stoffwechsel. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **18**. S. 112 (1894).

und noch viermal mit Äther ausgeschüttelt. Beim Einengen scheidet sich eine Substanz aus, welche aus kochendem Wasser umkristallisiert wird: α-Pyridinursäure (Glykokollverbindung der α-Pyridinkarbonsäure), Sp. 164—165°.

Mittelst heißgesättigten Barytwassers erfolgte in der Hitze eine Spaltung in Glykokoll und α-Pyridinkarbonsäure. Das Gemenge der Spaltungsprodukte wurde dreimal mit absolutem Alkohol verrieben, wobei Glykokoll ungelöst blieb, dagegen die α-Pyridinkarbonsäure ging in Lösung über und konnte durch das Barytsalz identifiziert werden.

Der nach Darreichung von β-Naphtoesäure[1]) von Kaninchen gelassene Harn wurde eingedampft, mit Alkohol ausgezogen, der Verdampfungsrückstand in Wasser gelöst. Beim Ansäuern schied sich ein dicker Kristallbrei aus, von dem beim Ausschütteln mit Äther ein Teil sehr leicht, ein Teil etwas schwerer überzugehen scheint. Die ätherischen Auszüge wurden zunächst auf 100 $cm^3$ abdestilliert; es schieden sich Kristalle ab, die nach gründlichem Auswaschen mit Äther lufttrocken wurden. Der abgegossene Äther wird ganz verdunsten gelassen und hinterläßt als Rückstand unveränderte β-Naphtoesäure.

Die zuerst aus dem Äther erhaltenen Mengen lösen sich schwer in kochendem Wasser und scheiden sich daraus fast vollständig in über zolllangen seideglänzenden Nadeln ab, die bei 160—170° schmelzen und Stickstoff enthalten. Bei der Spaltung mit Barytlösung wurden β-Naphtoesäure und Glykokoll erhalten.

Beim Hunde verlief dieses Verfahren ergebnislos; hier führte es aber im Falle der α-Naphtoesäure zu einem positiven Ergebnis, so daß sich also α- und β-Naphtoesäure bei Kaninchen und Hunden umgekehrt verhalten.

Die Aufsuchung der Uramidobenzoesäure[2]) geschah auf folgendem Wege: Der Harn der Tiere, welche reine Meta-amido-benzoesäure erhalten hatten, wurde im Wasserbade verdampft, mit Alkohol ausgezogen, der alkoholische Auszug eingedampft, in Wasser gelöst, mit Salzsäure oder Schwefelsäure stark angesäuert und wiederholt mit großen Mengen Äther ausgeschüttelt. Aus dem beim Abdestillieren des Äthers bleibenden dünnsirupösen Rückstand schieden sich nach 1—2 Tagen bräunlich gefärbte krümelige Massen ab, die durch Absaugen und Abpressen von der anhängenden Mutterlauge befreit wurden. Mitunter wurde auch die beim Abdestillieren des Äthers bleibende rückständige Flüssigkeit in Wasser gegossen, erwärmt und heiß filtriert: Ausscheidung von bräunlichen Körnchen. Man kann auch den eingedampften alkoholischen Auszug des Harns mit Essigsäure ansäuern und mit Äther schütteln. Das beim Verdunsten des Äthers bleibende Gemisch von Uramidobenzoesäure und

---

[1]) *R. Cohn*, l. c.

[2]) *E. Salkowski*, Weitere Beiträge zur Kenntnis der Harnstoffbildung; das Verhalten der Amidobenzoesäure im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 7. S. 93 (1882).

Amidobenzoesäure resp. Amidohippursäure ist durch Behandlung mit HCl-haltigem Wasser, in dem sich die Amidobenzoesäure und Amidohippursäure gut lösen, leicht zu trennen; in jedem Falle wurde die Rohsäure durch Waschen mit salzsäurehaltigem Wasser und wiederholtes Umkristallisieren mit Tierkohle gereinigt. Öfters wurde auch die Rohsäure mit Kalkmilch erwärmt, der Überschuß von Kalk durch Einleiten von Kohlensäure entfernt, das Filtrat mit Salzsäure angesäuert und mit Äther geschüttelt. Durch Behandeln mit Silberoxyd läßt sich daraus die Amidohippursäure gewinnen, Sp. 192°.

Der nach Darreichung von halogensubstituierten Toluolen[1]) gelassene Harn wurde zunächst mit Ammoniak alkalisch gemacht und im Glaskolben etwa 5 Minuten gekocht, wodurch er leichter durch Äther extrahierbar wird; nach dem Erkalten wird mit Phosphorsäure sauer gemacht und dann mit Äther ausgeschüttelt. Durch dieses Verfahren wurden nach Darreichung von bromsubstituierten Toluolen beim Kaninchen und Hund mit Glykokoll gepaarte Karbonsäuren erhalten, im Falle der chlorsubstituierten Toluole nur beim Hunde, während das Kaninchen die ungepaarten entsprechenden Benzoesäuren ausschied. Äthert man nach Zusatz von Salz- oder Schwefelsäure den Harn aus, so geht etwas Säure in den Äther und kann eine Spaltung der gepaarten Verbindung beim Abdampfen des Äthers bewirken.

Nach Darreichung von p-Nitrotoluol[2]) ließ sich im Harn des Hundes p-Nitrobenzoesäure nachweisen. Der alkoholische Auszug des Harns mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Äther geschüttelt, gab an letzteren reichliche Mengen einer braunen kristallinischen Masse ab, welche nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Alkohol unter Zusatz von Tierkohle schließlich schwach gelblich gefärbte Blättchen lieferte. Die Kristalle sind wasserfrei, stickstoffhaltig, in kaltem Wasser sehr schwer, in heißem leichter löslich. Wenn man den mit Äther von der Nitrobenzoesäure befreiten Harnextrakt mit einem Gemisch von Alkohol und Äther schüttelt, so geht in den Auszug eine cholesterinähnliche Substanz über, die aus sehr dünnen mikroskopischen Tafeln und Blättchen besteht. Trotz oft wiederholter Extraktion mit Alkoholäther ist aber die Ausbeute nur eine geringe. Dagegen fand sich gewöhnlich eine reichliche Quantität derselben Substanz als kristallinischer Bodensatz in dem sirupösen Harnrückstand ausgeschieden und konnte mittelst der *Bunsen*schen Pumpe von der sauren Mutterlauge getrennt werden. Die Kristalle wurden, da sie in Wasser und Alkohol sehr leicht löslich sind, nur ganz wenig ausgewaschen, auf Tonplatten getrocknet und mit Alkohol ausgekocht, wobei ein aus anorganischen Salzen bestehender Rückstand ungelöst blieb. Die filtrierte alkoholische Lösung erstarrte beim Erkalten zu einem Brei glitzernder

[1]) *H. Hildebrandt*, Über das Verhalten halogensubstituierter Toluole und der Amidobenzoesäuren im Organismus. Beitr. z. chem. Physiol. Bd. 3. S. 365 (1902).

[2]) *M. Jaffé*, Über das Verhalten des Nitrotoluols im tierischen Organismus. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 7. S. 1673 (1874).

Blättchen, die durch 2—3maliges Umkristallisieren aus Weingeist unter Zusatz von Tierkohle fast farblos wurden und nach dem Trocknen Perlmutterglanz zeigten. Die Kristalle waren, wie ihr Schmelzpunkt und die Analyse ergab, identisch mit den aus dem Alkoholätherextrakt gewonnenen. Kocht man die Substanz mit mäßig konzentrierter Salzsäure am aufsteigenden Kühler, so beginnt die Lösung nach kurzer Zeit sich zu trüben; es scheiden sich Kristalle aus, deren Menge bei weiterem Kochen zunimmt, nach ca. 1 Stunde ist die Umwandlung beendet; sie bestehen aus p-Nitrobenzoesäure. Die von der ausgeschiedenen Säure abfiltrierte saure Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbade zur Trockene verdampft, mit Alkohol extrahiert, der alkoholische Auszug abgedampft, in Wasser gelöst und mit Silberoxyd erwärmt. Das Filtrat vom Chlorsilber gab mit Alkohol gefällt einen weißen, kristallinischen, aus mikroskopischen Blättchen und Täfelchen bestehenden Niederschlag, der durch Auflösen im Wasser und abermalige Fällung mit Alkohol gereinigt und analysiert wurde. Der Silbergehalt stimmt mit dem des Glykokollsilbers überein (59·3% Ag).

Ein Teil der Silberverbindung wurde mit $SH_2$ entsilbert; aus dem Filtrat schieden sich beim Eindampfen harte prismatische Kristalle aus, welche süß schmeckten und mit Kupferoxyd eine mit Wasser lösliche und mit Alkohol in blauen Nadeln fällbare Verbindung lieferten: Glykokoll; gegenüber der oben beschriebenen perlmutterglänzenden Substanz unterschied sich die aus Nitrobenzoesäure und Glykokoll bestehende Nitrohippursäure durch den Atomkomplex des Harnstoffes, und in der Tat stellte es sich heraus, daß Harnstoff als solcher in der Verbindung enthalten ist. Nach Ausfällung des Glykokollsilbers konnte aus dem alkoholischen Filtrat durch Behandlung mit $H_2S$, Eindampfen und Extrahieren mit Alkohol Harnstoff dargestellt und nach Überführung in die salpetersaure Verbindung analysiert werden. Daß eine salzartige Verbindung der Nitrohippursäure mit Harnstoff vorliegt, wurde direkt nachgewiesen: die Verbindung wurde in Wasser gelöst, mit kohlensaurem Baryt bis zur Neutralisation versetzt, eingedampft und mit Alkohol extrahiert. Der Alkoholauszug hinterließ beim Verdunsten Kristalle, welche in ihrem Habitus, ihrem Verhalten beim Erhitzen, ganz mit Harnstoff übereinstimmten und mit Salpetersäure eine in den charakteristischen Formen des salpetersauren Harnstoffes kristallisierende, schwer lösliche Verbindung gaben. Daß in der Tat nitrohippursaurer Harnstoff vorlag, wurde durch Synthese festgestellt. Vermischt man mäßig konzentrierte Lösungen von reiner p-Nitrohippursäure und von Harnstoff in nahezu äquivalenten Mengen, so erstarrt das Gemisch fast augenblicklich zu einem Brei glänzender Blättchen, welche denselben Schmelzpunkt zeigen wie die aus dem Harn isolierte Verbindung.

Die Verbindung mit Harnstoff wäre übersehen worden, wenn die Untersuchung sich nur auf den Ätherextrakt des Harns beschränkt hätte.

Die p-Nitrohippursäure wurde aus der Harnstoffverbindung dargestellt, indem dieselbe, in das Barytsalz übergeführt, das letztere mit Schwefel-

säure zersetzt und mit Äther extrahiert wurde. Beim Umkristallisieren aus heißem Wasser scheidet sich die Säure zuerst in öligen Tropfen aus, welche allmählich zu großen, orangerot gefärbten Prismen erstarren.

Nach der Darreichung von Ortho-nitro-Toluol[1]) wurde der Harn der Tiere stets ganz frisch auf dem Wasserbade eingedampft und mit Alkohol extrahiert, der alkoholische Auszug verdunstet, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und wiederholt mit Äther geschüttelt. Aus der stark konzentrierten Ätherlösung kristallisierte die Ortho-nitro-benzoesäure alsbald in schönen, farblosen, sternförmig gruppierten Nadeln, welche durch Umkristallisieren aus heißem Wasser rein erhalten wurden und den charakteristischen süßlichen Geschmack zeigten; es wurde keine Nitrohippursäure gefunden.

Der nach Darreichung von Phenylpropionsäure[2]) vom Hunde gelassene Harn wurde auf Hippursäure verarbeitet.

Der Harn wurde bis zum zweiten Vormittag gesammelt mit der Vorsicht, daß in die untergestellte Flasche etwas Alkohol und Salzsäure gegossen wurden, um eine schnelle Zersetzung der Hippursäure zu verhindern. Dann wurde dreimal mit einer großen Menge Äther durchgeschüttelt. Jede durch den Scheidetrichter abgetrennte Portion einer ätherischen Lösung wird mit einer Menge von 20 $cm^3$ Wasser durchgeschüttelt und längere Zeit absetzen gelassen; das Wasser nimmt einen großen Teil des Harnstoffes und der anorganischen Salze heraus, die immer in eine alkoholisch-ätherische Lösung mit eingehen. Der nach Abdestillieren des Äthers bleibende Rückstand wurde mit Wasser und reinem Calciumkarbonat gekocht, das Filtrat mit Tierkohle behandelt und die von neuem filtrierte Lösung eingedampft. Der geringe hier bleibende Rückstand wurde in (25 $cm^3$) Wasser gelöst, mit Salzsäure angesäuert und dreimal mit dem gleichen Volumen Essigäther ausgeschüttelt. Der Rückstand wurde aus Wasser umkristallisiert: Hippursäure, Sp. 186°.

Dagegen geht Amidophenylessigsäure im Organismus zum größten Teil durch Austausch der Amidogruppe gegen die Hydroxylgruppe in Mandelsäure über, nach deren Fütterung überhaupt keine Hippursäure auftritt. Zur Darstellung der Mandelsäure wurde der durch Ätherextraktion gewonnene Rückstand mit Bariumkarbonat und Tierkohle gekocht: Bariumsalz, freie Säure, Sp. 117°.

Zur Gewinnung der Stoffwechselprodukte der nicht hydroxylierten aromatischen Säuren[3]) wurde der Harn eingedampft und nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure mit alkoholhaltigem Äther ausgezogen; im Falle der Phenylpropionsäure fand sich ausschließlich Hippursäure

---

[1]) *M. Jaffé*, Zur Kenntnis der synthetischen Vorgänge im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2. S. 47 (1878).

[2]) *C. Schotten*, Über die Quelle der Hippursäure im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 8. S. 60 (1883).

[3]) *E.* und *H. Salkowski*, Über das Verhalten der Phenylessigsäure und Phenylpropionsäure im Organismus. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Bd. 12. S. 653 (1879).

(Sp. 186°), nach Darreichung von Phenylessigsäure hauptsächlich Phenacetursäure; zu deren Darstellung wurden die Ätherrückstände mit Kalkmilch und Wasser erwärmt, der überschüssige Kalk durch Kohlensäure entfernt, das Filtrat mit Kohle behandelt und zur Kristallisation eingedampft. Aus dem Kalksalz wurde die Säure durch Salzsäure abgeschieden und durch mehrmaliges Umkristallisieren aus heißem Wasser gereinigt.

Nach Darreichung von Hydroparacumarsäure, Paraoxyphenylessigsäure, Paraoxybenzoesäure[1]) wurde der Harn in gleicher Weise verarbeitet. 1 *l* Harn wurde nach Zusatz von 5 *cm*³ konzentrierter Salzsäure aufgekocht. Nach dem Erkalten wurde 5mal mit alkoholhaltigem Äther extrahiert, der nach dem Verdunsten des Äthers gebliebene Rückstand in Wasser gelöst, die Lösung unter Zusatz von Tierkohle gekocht, nach dem Filtrieren eingedampft, wieder in Wasser gelöst und mit neutralem Bleiacetat gefällt. Die von dem Bleiniederschlage abfiltrierte Lösung wurde durch $SH_2$ vom überschüssigen Blei befreit und wieder zur Trockene eingedampft. Der nun bleibende Rückstand wurde, um stickstoffreie und stickstoffhaltige Säure zu trennen, mehrmals mit alkoholfreiem Äther extrahiert, die nach dem Verdunsten des Äthers bleibende Säure wurde mit Wasser aufgenommen und durch Filtrieren von einer geringen Menge Harz befreit. Die einmal aus Wasser umkristallisierte Säure erwies sich als unverändertes Ausgangsmaterial. Aus den Mutterlaugen lassen sich durch Fällen mit basischem Bleiacetat keine entsprechenden Produkte gewinnen.

Aus dem in absolutem Äther unlöslichen Anteil ließ sich im ersteren Falle eine in Wasser schwierig lösliche, stickstoffhaltige Säure gewinnen, welche die Glykokollverbindung der zu Paraoxybenzoesäure oxydierten Verbindung darstellt; in dieser Weise wurde auch die nach Darreichung der Paraoxybenzoesäure auftretende Paraoxybenzursäure isoliert.

Zu bemerken ist, daß beim Abdestillieren der nach Ansäuern mit Schwefelsäure erhaltenen alkoholisch-ätherischen Lösung eine Spaltung eintreten könnte, so daß lediglich die freien Säuren gefunden wurden, während nach Zufuhr großer Mengen ein Teil in gepaarter Form unzersetzt erhalten wurde.

Die Paraoxyphenylessigsäure wurde unverändert wiedergefunden.

Als Stoffwechselprodukt der Paraoxyphenylessigsäure wurde beim Hunde Oxyphenacetursäure[2]) nachgewiesen: Der Harn wurde erst mit gewöhnlichem Äther erschöpft und dann mit Essigäther extrahiert; aus dem Anteil der Essigätherextraktion bildeten sich Kristalle, die sich nach

---

[1]) *C. Schotten*, Über das Verhalten des Tyrosins und der aromatischen Oxysäuren im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 7. S. 23 (1882).

[2]) *E.* und *H. Salkowski*, Über das Verhalten der aus dem Eiweiß durch Fäulnis entstehenden aromatischen Säuren im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 7. S. 161 (1882).

Reinigung und Umkristallisieren aus Wasser als Oxyphenacetursäure, Sp. 153°, erwiesen.

Nach Darreichung von Mesitylen, $C_6H_3-(CH_3)_3$ [1]), wurde ein Harn entleert, welcher das Paarungsprodukt der Mesitylensäure, $C_6H_3(COOH)_3$, mit Glykokoll enthielt, da beim Destillieren mit Mineralsäure Mesitylensäure überging.

Der nach Darreichung von Äthylbenzol [2]) vom Hunde gelassene Harn wurde auf dem Wasserbade verdunstet, der sirupöse Rückstand in der Kälte mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Äther extrahiert; als Rückstand des Äthers hinterblieb Hippursäure: Oxydation des Äthyl zu Karboxyl.

Nach Darreichung der aromatischen Fettsäuren [3]) wurde der in den nächsten 48 Stunden gelassene Harn mit Soda schwach alkalisch gemacht, auf 100—200 $cm^3$ eingedampft und nach Ansäuerung mit Phosphorsäure im Schacherlapparat 20—30 Stunden mit Äther extrahiert; das Extrakt wurde zwecks Entfernung flüchtiger, die Kristallisation hemmender Substanzen in strömendem Wasserdampf destilliert, mit Tierkohle entfärbt, diese nochmals ausgekocht; die vereinigten Filtrate wurden eingedampft und zur Kristallisation hingestellt.

*Fr. Knoop* fand im normalen Harn eine verschwindend geringe Menge von Hippursäure.

Nach Eingabe von Phenylpropionsäure: Hippursäure und keine Phenacetursäure.

Nach Mandelsäure (inaktive): Unveränderte Mandelsäure.

Nach Phenylessigsäure: Phenacetursäure, keine Hippursäurevermehrung.

Nach Äthylbenzol: Hippursäure, keine Phenacetursäure.

*G. Bunge* und *O. Schmiedeberg* [4]) empfehlen die hippursäurehaltige saure Lösung mehrmals mit Essigäther auszuschütteln, welcher sehr vollständig sämtliche Hippursäure aufnimmt, leichter als der bei den bisherigen Methoden zum Ausschütteln der Hippursäure angewandte gewöhnliche Äther. Beim Ausschütteln mit Essigäther wird außer der Hippursäure auch Benzoesäure nebst der etwa noch vorhandenen geringen Fettmenge aufgenommen. Der abgegossene Essigäther wird mit Wasser gewaschen und in einer Glasschale bei mäßiger Temperatur der Verdunstung überlassen; der so erhaltene Rückstand besteht hauptsächlich aus Hippursäure, Benzoesäure und Fett. Das Fett und die Benzoesäure werden vollstän-

[1]) *L. v. Nenczki,* Über das Verhalten einiger aromatischer Verbindungen im Tierkörper. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **1**. S. 420 (1873).

[2]) *M. Nenczki* und *P. Giacosa,* Über die Oxydation der aromatischen Kohlenwasserstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **4**. S. 325 (1880).

[3]) *Fr. Knoop,* Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. Beitr. z. chem. Physiol. Bd. **6**. S. 150 (1904).

[4]) *G. Bunge* und *O. Schmiedeberg,* Über die Bildung der Hippursäure. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **6**. S. 233 (1877).

dig entfernt durch „Petroleumäther", welcher diese Stoffe leicht aufnimmt, die Hippursäure aber völlig ungelöst läßt. Dieser Rückstand wird in warmem Wasser gelöst, mit ein wenig Tierkohle behandelt und filtriert. Das Filtrat wird in einer kleinen Glasschale bei mäßiger Temperatur (höchstens 50—60°) eingeengt, bis beim Erkalten die Hippursäure herauszukristallisieren anfängt. Die Trennung von der Milchsäure geschieht vermittelst des Zinksalzes, welches im Falle der Milchsäure im Alkohol fast ganz unlöslich ist.

*J. Levinsky*[1]) bediente sich der gleichen Methode, verwandte aber zum Ansäuern des Alkoholextraktes Phosphorsäure an Stelle der Salzsäure. Er empfiehlt, die letzte Portion des zum Ausschütteln verwandten Essigäthers getrennt zu verdampfen, um sich zu überzeugen, daß der letzte Rest Hippursäure aufgenommen ist. Das Abdunsten muß in genügend großen Glasschalen geschehen, damit nichts von der Substanz über den Rand steigt. Der Rückstand ist aus kleinsten Flüssigkeitsmengen umzukristallisieren; schließlich läßt man die gereinigte Substanz auf dem Boden eines engen Becherglases auskristallisieren und wartet das Ausfallen von Kristallen in der eingeengten Mutterlauge ab. *Y. Seo*[2]) bestimmt:

1. Die präformierte Benzoesäure durch Ausschütteln des eingeengten Harnextraktes mit Petroläther nach Ansäuern mit Phosphorsäure.

2. Durch Destillation des Harns mit Schwefelsäure die Gesamtbenzoesäure und berechnet aus beiden die Menge der gepaarten Benzoesäure. Die Destillation mit Schwefelsäure wird etwa 10mal wiederholt, indem immer wieder die durch die Destillation entfernte Wassermenge ergänzt wird. Das gesamte Destillat wird durch Natriumkarbonat schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade bis auf wenige Kubikzentimeter eingeengt, mit Phosphorsäure versetzt und mit Petroläther ausgeschüttelt. Das Auswaschen des Petroläthers wird stets mit derselben Wassermenge ausgeführt.

Hippursäure kann schon beim 48stündigen Stehen des Harns zur Hälfte gespalten werden.

*J. Wohlgemuth* und *C. Neuberg*[3]) bemängelten das Extrahieren des Harns bei mineralsaurer Reaktion und behaupten, daß eine Spaltung der Hippursäure dadurch bedingt werde, was von anderer Seite[4]) bestritten wird.

Zur Bestimmung der im Harn entleerten Hippursäure und Benzoesäure[5]) wird der Harn sofort nach seiner Gewinnung in einer offenen

---

[1]) *J. Levinsky,* Über die Grenzen der Hippursäurebildung beim Menschen. Arch. f. experim. Pharm. Bd. 58. S. 397 (1908).

[2]) *Y. Seo,* Über die Hippursäurespaltung durch Bakterien und ihre Bedeutung für den Nachweis von Benzoesäure und Glykokoll im Harn. Arch. f. exp. Pharm. Bd. 58. S. 448 (1908).

[3]) *J. Wohlgemuth* und *C. Neuberg,* Zur Frage des Vorkommens von Aminosäuren im normalen Harn. Med. Klinik. S. 27 (1906).

[4]) *G. Embden* und *A. Marx,* Über das Glykokoll des normalen Harns. Beitr. z. chem. Physiol. Bd. 11. S. 308 (1908).

[5]) *R. Cohn,* Zur Frage der Glykokollbildung im tierischen Organismus. Arch. f. exp. Pharm. Bd. 53. S. 435 (1905).

Schale zur Trockene verdampft und dreimal mit größeren Mengen kochenden Alkohols auf dem Wasserbade extrahiert. Der Rückstand des Alkoholextraktes wurde auf dem Wasserbade in so wenig Wasser als möglich gelöst, in einen Schütteltrichter gegossen, abgekühlt und mit konzentrierter Salzsäure stark angesäuert, hierauf mit großen Portionen Äther viermal ausgeschüttelt. In den Äther geht die gesamte freie Benzoesäure und ein Teil der Hippursäure über, während meistens ein Teil der ausgeschiedenen Hippursäure in dem Äther über der salzsauren wässerigen Schicht resp. in dieser suspendiert bleibt und zum Teil mit dem Äther abgegossen wird. Hierauf wird der Äther nach dem Absetzen der mitgerissenen Hippursäure abfiltriert, der letzte Rest noch mit frischem Äther mehrmals nachgeschüttelt und vollständig abdestilliert, der trockene Rückstand mindestens viermal mit großen Mengen Petroläther im Rückflußkühler ausgekocht. Der Petroläther enthält nun die sämtliche freie Benzoesäure, die durch Abdestillieren im Kölbchen und Verdunsten des letzten Petroläthers bis zur Trockene in einem gewogenen, hohen Bechergläschen auf dem Wasserbade gewonnen wird und sofort gewogen werden kann. Hierauf werden sämtliche Hippursäure enthaltenden Portionen in einem Rundkolben vereinigt, indem man die in dem mit Petroläther ausgekochten Kolben enthaltenen Anteile in wenig kochender konzentrierter Salzsäure löst resp. damit aus dem Kolben ausspült, der Ätherrest wird aus der salzsauren Lösung durch Erwärmen verjagt und mit der mindestens dreifachen Menge konzentrierter Salzsäure wird 5 Stunden am Rückflußkühler auf dem Sandbade gekocht, was zur Spaltung der gesamten Hippursäure genügt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung, in der sich gewöhnlich schon ein Teil der Benzoesäure ausgeschieden hat, viermal mit Äther geschüttelt. Der Äther enthält die gesamte gebundene Benzoesäure, die durch Abdestillieren, Verdunsten des letzten Restes und Trocknen im Exsikkator gewonnen wird.

*M. Jaffe*[1]) gelang es nachzuweisen, daß im Organismus der Vögel als Hauptumwandlungsprodukt eine stickstoffhaltige, von der Hippursäure durchaus verschiedene Säure auftritt, welche aber ebenso wie diese als eine gepaarte Benzoesäure betrachtet werden muß: Ornithursäure. Ihre Darstellung geschieht in folgender Weise: Die frischen Exkremente der mit Benzoesäure gefütterten Hühner werden mit Weingeist ausgekocht, das Filtrat abgedampft, nochmals mit heißem absoluten Alkohol aufgenommen und wieder verdunstet. Der gewöhnlich stark sauer reagierende Rückstand wird nunmehr mit etwas Wasser versetzt und im Kolben mehrmals mit großen Portionen Äther geschüttelt. Hierdurch werden Fette, Fettsäuren, die überschüssige freie Benzoesäure, welche in den Extrakten niemals fehlt, aber auch ein Teil der Ornithursäure in Lösung gebracht, da letztere, so lange sie unrein, in Äther nicht ganz unlöslich ist. Nach dem Abgießen des Äthers wird der Rückstand mit verdünnter Schwefelsäure versetzt und

[1]) *M. Jaffé*, Über das Verhalten der Benzoesäure im Organismus der Vögel. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **10**. S. 1925 (1877).

abermals mit großen Mengen Äther geschüttelt, welche neue Portionen des Umwandlungsproduktes aufnehmen. Die ätherischen Lösungen werden nunmehr etwas eingeengt und in verschlossenen Gefäßen bei kühler Temperatur einige Tage stehen gelassen. Allmählich scheidet sich dann der größte Teil der gelösten Ornithursäure in farblosen oder schwach gefärbten blättrig-kristallinischen Massen aus, welche durch Waschen mit etwas Äther gereinigt werden. Der bei weitem größte Teil scheidet sich in dem mit Äther erschöpften Extrakte der Exkremente als schwarzbraune schmierige Masse ab, welche gewöhnlich nach einigen Tagen in den kristallinischen Zustand übergeht. Diese Masse wird dann abfiltriert, mit Wasser gewaschen, alsdann in heißem Wasser und Ammoniak gelöst und die Lösung einige Zeit mit Kalkmilch gekocht; das Filtrat wird mit Kalium hypermanganicum entfärbt. Wenn man dann mit Salzsäure übersättigt, so scheidet sich die Ornithursäure in Form einer milchigen Trübung aus, welche sich alsbald zu einer zähen, elastischen, harzähnlichen Masse verdichtet, die im Laufe von 24 Stunden zu einem kristallinischen Pulver zerfällt. Schließlich wird mehrmals aus heißem Alkohol umkristallisiert, bis der Sp. 182° konstant wird. Zusammensetzung: $C_{19} H_{20} N_2 O_4$.

Wenn man am aufsteigenden Kühler einige Stunden mit starker Salzsäure kocht, so tritt Lösung ein und beim Erkalten scheidet sich reine Benzoesäure (Sp. 120°) aus, und zwar in einer zwei Molekülen entsprechenden Menge. In der salzsauren Lösung ist eine neue organische Base enthalten, welche mit Salzsäure zwei Reihen von Salzen bildet (mit $1\frac{1}{2}$ und 1 Molekül Säure): Diamidovaleriansäure ($C_5 H_8 [NH_2]_2 O_2$).

## Gepaarte Glykuronsäuren.

Bei seinen Untersuchungen über die Stoffwechselprodukte des Orthonitro-toluols beobachte *M. Jaffe*[1], daß sein Hauptumwandlungsprodukt nicht in den Ätherextrakt überging; es schied sich vielmehr in dem sirupösen, mit Äther erschöpften sauren Harnrückstande allmählich in Form eines aus Nadeln bestehenden Kristallbreies aus, und zwar um so schneller und vollständiger, je gründlicher die vorangegangene Behandlung mit Äther war und je niedriger die umgebende Temperatur. Die Kristalle wurden durch Abfiltrieren auf dem Pumpenfilter sorgfältig von der Mutterlauge befreit, erst mit wenig Wasser, dann mit Alkohol gewaschen, auf Tonplatten getrocknet und schließlich mehrmals aus heißem Alkohol umkristallisiert. Die Lösung der Substanz zeigte stark linkseitige Polarisation und reduzierte alkalische Kupferlösung in der Wärme zu Oxydul.

Wenn man die wässerige Lösung des neuen Produktes mit kohlensaurem Baryt kocht, das Filtrat konzentriert und mit absolutem Alkohol fällt, so scheidet sich das Bariumsalz zunächst als gallertartige amorphe Masse aus, wird aber beim Aufkochen mit dem Alkohol kristallinisch. Aus

---

[1]) Zur Kenntnis der synthetischen Vorgänge im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2. S. 49 (1878).

dem alkoholischen Filtrate, welches bei der Darstellung des Bariumsalzes gewonnen wurde, konnte der Harnstoff durch Abdampfen und Fällen des Rückstandes mit Salpetersäure leicht isoliert werden. In dem Produkte aus dem Harn liegt eine Verbindung vor von Harnstoff mit der Uronitrotoluolsäure $C_{13}H_{15}NO_{9}$; man stellt diese aus dem Bariumsalz dar, indem man die wässerige Lösung des letzteren vorsichtig mit verdünnter Schwefelsäure bis zur Ausfällung des Baryts versetzt und das Filtrat auf dem Wasserbade eindampft. Der sirupartige Rückstand erstarrt unter dem Exsikkator zu einer farblosen, strahlig-kristallinischen Masse, deren Lösungen intensiv sauer reagieren und reduzieren. Nach 1—2stündigem Kochen mit 4—5%iger Schwefelsäure wurde der Kolbeninhalt abgekühlt, mit Äther geschüttelt, der abgehobene Äther durch kohlensaures Natron entfärbt und abdestilliert; er hinterließ einen kristallinischen Rückstand. Diese Masse löst sich schwer in heißem Wasser und erstarrt beim Abkühlen, Sp. 74°. Die Analyse und das Verhalten der Substanz stimmt auf Orthonitrobenzylalkohol; als zweiter Bestandteil in der Säure ist der Atomkomplex $C_6H_{10}O_7$ anzunehmen.

Durch Behandeln des Harns mit Bleiessig haben *v. Mering* und *Muskulus* [1]) aus dem Chloralharn eine linksdrehende Substanz gefällt, die in einem Gemenge von Alkohol und Äther löslich war. Der Harn wurde bis zur Sirupkonsistenz auf dem Wasserbade eingedampft und mit Alkohol und Äther geschüttelt, die gesuchte Substanz ging nicht in die Lösung. Die Autoren vermuteten, daß die Substanz eine an Basen gebundene Säure sein könne und fügten, nachdem Zusatz von Essigsäure erfolglos gewesen war, eine Mineralsäure (Schwefelsäure, Salzsäure) hinzu und erhielten die linksdrehende Substanz in der ätherisch-alkoholischen Lösung. Der Chloralharn wurde auf dem Wasserbade eingedampft, mit Schwefelsäure versetzt und mit dem zweifachen Volumen Äther und einfachen Volumen Alkohol geschüttelt. Der Äther wird abdestilliert, der Rückstand mit Kalilauge neutralisiert, eingedampft, mit 90%igem Alkohol aufgenommen, filtriert, das Filtrat mit Äther gefällt, der Niederschlag in Wasser gelöst, mit Tierkohle entfärbt und auf ein geringes Volumen eingedampft. Beim Erkalten bildet sich eine kristallinische Masse, welche zum größten Teil aus dem Kalisalz der gesuchten Säure besteht. Trocknen über Schwefelsäure im Vakuum, mehrmaliges Waschen mit absolutem Alkohol, um das Salz von Harnstoff und hippursaurem Kalium zu reinigen. Um die freie Säure zu isolieren, wird das Kalisalz in möglichst wenig Wasser gelöst, ein nicht zu großer Überschuß von Salzsäure zugefügt und mit einem Gemenge von 2 Volumen Äther und 1 Volumen Alkohol geschüttelt und filtriert. Die größte Menge des Chlorkaliums bleibt hierbei auf dem Filter; dann wird das Filtrat mit einem großen Überschuß von Äther versetzt und 48 Stunden stehen gelassen, worauf sich noch ein ziemlich bedeutender Niederschlag bildet. Das Filtrat wird abdestilliert, dem Rückstande feuchtes

[1]) *v. Mering* und *Muskulus*, Über einen neuen Körper im Chloralharn. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 8, S. 662 (1875).

Silberoxyd hinzugefügt, bis die Chlorsilberausscheidung aufhört; der Überschuß von in Lösung gegangenem Silberoxyd wird mit $SH_2$ schnell abgeschieden und hierauf das Filtrat bis zur Sirupkonsistenz eingedampft. Nach 12 Stunden kristallisiert die Säure, besonders leicht, wenn sie nach wiederholtem Reinigen mit Äther nicht mehr mit Stickstoff verunreinigt ist. Die Substanz rötet blaues Lackmuspapier und zersetzt kohlensaure Salze. Sie reduziert beim Kochen alkalische Kupferlösung und besitzt linksseitige Circumpolarisation: Urochloralsäure ($C_7H_{12}Cl_2O_6$).

Später wandte *v. Mering*[1]) folgendes Verfahren an: der mit Schwefelsäure angesäuerte Verdampfungsrückstand des Harns wurde mit 3 Volumen Äther und 1 Volumen Alkohol wiederholt ausgeschüttelt, nach dem Abdestillieren wurde der Rückstand mit kohlensaurem Kali oder Kalilauge neutralisiert, eingedampft, mit 90%igem Alkohol aufgenommen, filtriert und das Filtrat mit Äther gefällt. Der getrocknete Niederschlag wurde mit absolutem Alkohol ausgekocht und die alkoholische Lösung heiß filtriert; beim Erkalten scheidet sich bald das Kaliumsalz der Urochloralsäure in farblosen, seidenglänzenden, büschelförmig gruppierten Nadeln aus; als Spaltungsprodukt wurde Trichloräthylalkohol nachgewiesen.

Zur Abscheidung des anderen Spaltungsproduktes wurde Urochloralsäure mit 7%iger Salzsäure 2 Stunden lang am Rückflußkühler im Sieden erhalten; die Flüssigkeit dann mit frischgefälltem kohlensauren Bleioxyd neutralisiert, filtriert, das Filtrat eingeengt und mit Alkohol gefällt, nunmehr das Blei entfernt und das Bariumsalz hergestellt: Glykuronsaures Barium.

Der Trichloräthylalkohol ist durch Reduktion aus Chloralhydrat entstanden, ebenso wie der Trichlorbutylalkohol aus Butylchloralhydrat.

Die nach Darreichung von tertiärem Butylalkohol (Trimethylkarbinol) und Amylalkohol[2]) (Dimethyläthylkarbinol) im Harn auftretende linksdrehende Substanz war durch Bleiessig nicht fällbar und in Äther sehr schwer löslich. Der gesamte Harn wurde stark eingedampft, mit Schwefelsäure stark angesäuert, zur Entfernung der Hippursäure wiederholt mit großen Mengen Äther geschüttelt und mit einer Mischung von Alkohol und Äther mehrmals extrahiert. Nachdem dann die ätherisch-alkoholische Lösung zum Teil abdestilliert worden war, wurde mit Barytwasser neutralisiert und eingedampft. Nunmehr säuert man nochmals an und schüttelt noch mehrmals mit Äther aus; auf diese Weise gelang es, alle Hippursäure zu entfernen. Jetzt wurde wiederum mit Barytwasser neutralisiert, filtriert, und das Filtrat mit einer Lösung von schwefelsaurem Kali versetzt, so lange, als noch Bariumsulfat ausfiel, und wiederum filtriert. Der beim Eindampfen sich bildende hellgelbe Sirup wurde mehrmals mit kaltem Alkohol geknetet, um den Harnstoff zu entfernen, dann mit Alcohol abs. ausgekocht und

[1]) *v. Mering*, Über das Verhalten des Chloralhydrats und Butylchloralhydrats im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 6. S. 480 (1882).

[2]) *H. Thierfelder* und *J. v. Mering*, Das Verhalten tertiärer Alkohole im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8. S. 511 (1885).

filtriert, das Filtrat trübte sich sofort milchig und schied beim Erkalten weiße, büschelförmig gruppierte Nadeln aus, die zur Reinigung eventuell noch mehrmals aus Alkohol umkristallisiert wurden. Durch Fällen der alkoholischen Mutterlauge mit Äther erhält man weitere Mengen der Stoffwechselprodukte: Trimethylkarbinol- resp. dimethyläthylkarbinolglykuronsaures Kali.

Nach Darreichung von Phenetol[1]) am Hunde färbte sich der Harn bald dunkel und enthielt die Schwefelsäure in gebundener Form. Bei der Destillation mit Säuren lieferte er kein Phenol, sondern andere, der aromatischen Reihe angehörige, nicht näher untersuchte Körper. Das Hauptprodukt der Umwandlung des Phenols wird in folgender Weise erhalten: Der eingedampfte Harn wird mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Abdestillieren des Äthers erstarrt unter günstigen Bedingungen das Extrakt im Laufe von 8 Tagen zu warzenförmigen Kristallen, die durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Alkohol in reinem Zustande erhalten wurden. Auf diese Weise wird eine lockere, leicht pulverisierbare weiße Masse erhalten, die in Wasser und Alkohol leicht, in Äther schwer löslich ist: Eine stickstofffreie Säure, Chinaethonsäure, dreht nach links und reduziert nicht *Fehling*sche Lösung beim Kochen. Zur Gewinnung des Bariumsalzes wurde das alkoholisch-ätherische Extrakt des eingedampften und angesäuerten Harns in Wasser gelöst und dann mit einem Überschuß von Bariumkarbonat eingedampft, vom überschüssigen kohlensauren Baryt durch Filtration befreit, das eingeengte Filtrat mit Alkohol versetzt: es bildet sich ein Niederschlag, der beim Sieden der alkoholischen Lösung größtenteils in Lösung geht: die Flüssigkeit wird heiß filtriert, beim Erkalten scheidet sich der chinaethonsaure Baryt als amorpher, undeutlich kristallinischer Niederschlag ab.

Aus wässeriger Lösung bilden sich bisweilen sternförmig gruppierte Nadeln. Fügt man zu einer wässerigen Lösung der Säure Barytwasser, so fällt ein flockiger Niederschlag aus, der sich leicht durch Hindurchleiten von Kohlensäure in Lösung bringen läßt. Es scheint hiernach, als ob die Säure imstande ist, zwei Reihen von Salzen zu bilden. Aus dem Barytsalz läßt sich durch Hinzufügen von Schwefelsäure unter Vermeidung eines Überschusses die freie Säure leicht darstellen; durch Eindampfen der Lösung mit kohlensaurem Kali wurde ihr Kaliumsalz gewonnen; der Alkoholextrakt wird heiß filtriert, beim Erkalten schied sich das Salz in langen, dünnen, sternförmig gruppierten reinweißen Nadeln aus. Aus dem Kaliumsalz wurde mittelst Silbernitrat das Silbersalz erhalten, das sich in kleinen, weißen Nadeln ausschied: $C_{14}H_{17}O_9Hg$.

Wird die aus dem Bariumsalz dargestellte Chinäthonsäure mit Salzsäure oder Schwefelsäure längere Zeit gekocht, so zerfällt sie in zwei Spaltungsprodukte, deren eines durch Ausschütteln mit Äther aus der

---

[1]) *A. Kossel,* Über das Verhalten von Phenoläthern im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4. S. 296 (1880).

Lösung entfernt werden kann, während das andere, die Glykuronsäure, in der wässerigen Lösung zurückbleibt; der in Äther lösliche Teil enthält den aromatischen Atomkomplex und ist eine Para-Verbindung, da durch Destillation mit Braunstein und Schwefelsäure Chinon in reichlicher Menge erhalten wurde; durch Einwirkung von Jodwasserstoffsäure auf die gepaarte Verbindung wurde Hydrochinon erhalten.

Später wandte *V. Lehmann*[1]) die Ausschüttelung des mit Schwefelsäure angesäuerten Phenetolharns mit Essigäther an; der abgetrennte Essigäther wird mit überschüssigem kohlensauren Baryt versetzt und abdestilliert, der Rückstand mit Wasser zum Sieden erhitzt, heiß filtriert und das Filtrat auf ein kleines Volumen eingedampft. Nach mehrtägigem Stehen kristallisieren die Barytdoppelsalze heraus; sie werden aus Wasser umkristallisiert und die Lösung mit neutralem schwefelsauren Kali umgesetzt. Die vom schwefelsauren Baryt abfiltrierte Flüssigkeit dampft man zur Trockene ein und extrahiert den Rückstand mit siedendem starken Alkohol; das chinaethonsaure Kali kristallisiert aus der heißfiltrierten alkoholischen Lösung beim Erkalten aus, die Kalisalze der gepaarten Schwefelsäuren bleiben in Lösung; sie stammen zum Teil aus dem gefütterten Phenetol.

Zur Darstellung der freien Chinaethonsäure wurde das Kalisalz in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure angesäuert und die Lösung mit Essigäther ausgeschüttelt, der Essigäther unter Zusatz von kohlensaurem Barium abdestilliert. Das zurückbleibende Bariumsalz wurde mit Schwefelsäure zersetzt; aus dem Rückstand kristallisiert die freie Säure aus, Sp. 146°. Ihr Spaltungsprodukt ist Paraoxyphenetol, Sp. 66°.

Der Harn von Menschen, welcher nach Thymol[2])-Eingabe stärker nachdunkelte, wurde mit etwa $^1/_3$ seines Volumens an konzentrierter Salzsäure und darauf mit mindestens ebensoviel einer verdünnten Lösung von unterchlorigsaurem Natrium versetzt. Schon bei Zimmertemperatur bilden sich in den nächsten 48 Stunden in der Flüssigkeit zahlreiche bis 5 *mm* lange Kristallnadeln. Nach etwa 96 Stunden ist die Kristallisation beendet; es wird filtriert und der Filterrückstand zunächst mit Wasser ausgewaschen und dann mit Sodalösung übergossen. Das Filtrat wird mehrfach mit Äther ausgeschüttelt, der wässerigen Lösung Schwefelsäure zugesetzt, wodurch sofort die Säure in feinen, weißen Nadeln ausfällt: Dichlorthymolglykuronsäure, Sp. 125—126°.

Der nach subkutaner Darreichung von Syringin[3]) vom Kaninchen gelassene Harn wurde dem Bleiverfahren unterworfen und der mit Bleiessig erhaltene Niederschlag mit destilliertem Wasser gut ausgewaschen.

[1]) *V. Lehmann*, Über die Chinaethonsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13. S. 181 (1888).

[2]) *F. Blum*, Über Thymolglykuronsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16. S. 514 (1892).

[3]) *H. Hildebrandt*, Zur Frage der glykosidischen Struktur gepaarter Glykuronsäuren. Beitr. z. chem. Physiol. Bd. 7. S. 438 (1905).

dann über das Barytsalz auf das Kalisalz der gepaarten Verbindung verarbeitet; beim Einengen im Vakuum schieden sich reichliche Mengen anorganischer Stoffe ab, die durch Absaugen abgeschieden wurden. Das Filtrat wurde von neuem verdunstet und da sich auch jetzt nichts Kristallinisches ausschied, völlig getrocknet. Die trockene Masse wurde wiederholt mit heißem absoluten Alkohol extrahiert und die filtrierten Extrakte durch Abdestillieren des Alkohols konzentriert. Beim Abkühlen schied sich eine schneeweiße Masse ab, das Kalisalz der Glykosyringasäure *(Körner)*, welche durch Zerlegung ihres Bleisalzes mit $SH_2$ selbst gewonnen wurde, Sp. 208°. Der von dieser Verbindung befreite Rückstand wurde in Wasser gelöst und nochmals dem Bleiverfahren unterworfen, wobei über das Barytsalz ein Kalisalz gewonnen wurde, welches deutlich die Pentosenreaktion zeigte: Syringaglykuronsaures Kali. Durch Spaltung mit Emulsin gab es Syringasäure.

Durch das analoge Verfahren wurde nach subkutaner Injektion von Coniferin erhalten: Vanillinglykuronsaures Kali, dagegen nicht das entsprechende Zwischenprodukt der Oxydation: Die Glyko-vanillinsäure *(Tiemann)*.

Die Propenylgruppe des Syringins und die Allylseitenkette des Coniferins werden demnach im Organismus zu Carboxyl oxydiert.

Der mit basischem Bleiacetat aus Kaninchenharn nach Darreichung von Vanillin[1]) erhaltene Niederschlag wurde mit Bariumsulfid zerlegt und das vom Schwefelblei befreite Filtrat im Vakuum bei 33—40° eingeengt. Aus dieser eingeengten Flüssigkeit wurde die Bariumverbindung des Stoffwechselproduktes durch Zusatz von Alkohol gefällt und durch wiederholte Auflösung im Wasser und Umfällung mit Alkohol gereinigt: glykuronvanillinsaures Barium. Beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure wurden als Spaltungsprodukte Vanillinsäure und Glykuronsäure erhalten.

Der nach täglichen Dosen von 3—5 *g* α- oder β-Naphtol[2]) von Hunden gelassene Harn wurde mit Bleiessig vollkommen ausgefällt, der entstandene Bleiniederschlag mit kaltem Wasser ausgewaschen und auf Fließpapier an der Luft getrocknet, sodann mit überschüssiger Salzsäure (spez. Gew. 1·12) zu einem Brei angerührt und mit Äther extrahiert. Die abgehobene ätherische Schicht hinterläßt nach Abdestillieren des Äthers einen sirupösen Rückstand, der im Falle der Eingabe von β-Naphtol durch Zusatz von etwas Wasser in wenigen Minuten zu einem Kristallbrei erstarrt. Die Abscheidung von α-Naphtolglykuronsäure geht etwas langsamer vor sich, doch kristallisiert auch diese Säure nach etwa 24stündigem Stehen ziemlich vollständig aus. Die abfiltrierten und zwischen Fließpapier abgepreßten Kristalle der β-Naphtolglykuronsäure werden zunächst

[1]) *Y. Kotake*, Über das Schicksal des Vanillins im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **45**. S. 320 (1905).

[2]) *M. Lesnik*, Über einige Ester der Salicylsäure und ihr Verhalten im Organismus. Arch. f. exp. Pharm. Bd. **24**. S. 167 (1888).

durch Schütteln mit Chloroform, worin sie nur spurenweise löslich sind von etwas beigemengtem Naphtol befreit. Durch 2–3maliges Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle wird sie dann in farblosen, oft mehrere Zentimeter langen Nadeln erhalten. $C_{16}H_{16}O_7 + H_2O$. Sp. 150°. Der Mensch liefert die gleiche Säure.

Die α-Naphtolglykuronsäure kristallisiert ebenfalls in langen, farblosen Nadeln (Sp. 202–203°). In Wasser ist sie leichter löslich als die β-Säure. Ihre wässerige Lösung mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt färbt sich intensiv smaragdgrün, besonders schön, wenn man zu einer Spur der gelösten Säure konzentrierte Schwefelsäure zufließen läßt, wobei an der Berührungsfläche der beiden Flüssigkeitsschichten die Färbung erscheint. Eine Lösung der β-Verbindung gibt mit Schwefelsäure eine schöne blaugrüne Färbung.

Durch das gleiche Verfahren wurde nach Darreichung von Naphtalin beim Hund und Mensch die α-Naphtolglykuronsäure gewonnen.

Der nach Darreichung von Salicylsäure-β-Naphtoläther vom Mensch gelassene Harn wurde auf dem Wasserbad zum Sirup verdunstet, mit Alkohol extrahiert, der alkoholische Auszug von neuem eingedampft, der erkaltete Rückstand mit Salzsäure angesäuert und mit Äther extrahiert; nach Abdestillieren des Ätherextraktes hinterblieb ein saurer Rückstand, der sehr bald kristallinisch erstarrte und nach 2maligem Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle weiße Kristalle (Sp. 160°) ergab. Der Körper war N-haltig und färbte sich mit Eisenchlorid violett: Salicylursäure (mit Rücksicht auf den zu niedrigen Schmelzpunkt wohl unrein).

Ein Derivat des Chinolins, welches die OH-Gruppe im Pyridinkern trägt, das Carbostyril[1], wurde an Kaninchen verfüttert und der Harn nach dem Bleiverfahren verarbeitet; das aus dem Bariumsalz gewonnene Kalisalz kristallisierte erst auf Zusatz von Alkohol zur heißen Salzlösung, bei nachträglichem Einengen im Vakuum, und zwar in schwefelgelben Nadeln, aus deren Lösung die freie Säure durch Mineralsäuren kristallinisch abgeschieden wurde.

Nach Darreichung von Kynurin (durch Schmelzen der reinen Kynurensäure dargestellt) wurde ein Harn entleert, welcher im basischen Bleiniederschlage den Hauptteil der linksdrehenden Substanz enthielt, während ein kleiner Anteil erst aus dem Filtrat durch viel Ammoniak gefällt wurde. Es wurde eine schwefelhaltige Glykuronsäureverbindung isoliert.

Bei seinen Untersuchungen über die Stoffwechselprodukte des Kampfers hat *C. Wiedemann*[2]) aus dem Ammoniumsalz einer im Harn auf-

---

[1]) *B. v. Fenyvessy*, Über das Schicksal einiger isomerer Oxychinoline (Carbostyril und Kynuren) im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30. S. 552 (1900).

[2]) *C. Wiedemann*, Beiträge zur Pharmakologie des Kampfers. Arch. f. exp. Pharm. Bd. 6. S. 230 (1877).

tretenden Säure durch Bariumhydroxyd eine basische Bariumverbindung erhalten, aus der er durch Einleiten von Kohlensäure die neutrale Bariumverbindung gewann. Diese läßt sich nach dem Eintrocknen durch Kochen mit Alkohol in Lösung bringen und scheidet beim Erkalten ein Barytsalz aus, das sich über Schwefelsäure vollständig trocknen läßt. Die aus der Bariumverbindung erhaltene freie Säure ist eine sirupartige, nicht kristallisierbare Masse, welche beim Erwärmen mit Schwefel- oder Salzsäure in einen reduzierenden Bestandteil zerfällt und einen durch Äther extrahierbaren, ein kristallinisches flüchtiges Kampferderivat.

Diese Untersuchungen wurden von *O. Schmiedeberg* und *H. Meyer* [1]) fortgesetzt: sie fällten den Harn mit Bleiessig und Ammoniak, zersetzten den ausgewaschenen Niederschlag mit Ammoniumkarbonat, behandelten das Filtrat in der Wärme mit Bariumhydroxyd, bis alles Ammoniak entwichen war und entfernten den überschüssigen Baryt durch Einleiten von Kohlensäure. Aus der eingedampften Lösung wird durch Zusatz von Alkohol die Bariumverbindung der gesuchten Säuren gefällt.

Auch folgendes Verfahren wandten sie mit Vorteil an: der zur Sirupdicke eingedampfte Harn wird mit reichlichen Mengen von feuchtem Bariumhydroxyd versetzt, die Einwirkung des letzteren durch Erwärmen unterstützt und die Masse mit Alkohol behandelt; neben vielen anderen Harnbestandteilen bleibt eine basische Bariumverbindung der in Frage stehenden Säuren ungelöst.

Wenn man diese Rückstände mit reichlichen Mengen von Wasser anrührt, die Flüssigkeit abfiltriert und nach Zusatz neuer Mengen Bariumhydroxyd auf dem Wasserbade einengt, so entsteht eine in Wasser schwer lösliche, amorphe, basische Bariumverbindung, die eine sehr lockere und poröse Beschaffenheit hat. Sie wird auf dem Filter ausgewaschen und zur Gewinnung der freien Säure mit Schwefelsäure zersetzt. Das Waschwasser liefert beim Eindampfen und weiteren Zusatz von Baryt neue Mengen dieses basischen Salzes.

Auch das nach dem zuerst angewandten Verfahren dargestellte Bariumsalz wird zweckmäßig in diese basische Verbindung übergeführt und auf dem Filter ausgewaschen, bevor man aus ihm die Säure frei macht.

Die letztere bildet nach dem Eindampfen einen bräunlichen oder gelben, nur schwer eintrocknenden Sirup, in welchem folgende Bestandteile nachgewiesen wurden:

1. Eine stickstofffreie, gut kristallisierende Säure: α-Camphoglykuronsäure.

2. Eine isomere, amorphe Säure: die β-Camphoglykuronsäure.

3. Eine amorphe, stickstoffhaltige Säure, wahrscheinlich Uramidocamphoglykuronsäure.

[1]) *O. Schmiedeberg* und *H. Meyer*, Über Stoffwechselprodukte nach Kampferfütterung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3. S. 435 (1879).

Das Säuregemenge bildet einen Sirup, welcher beim Stehen an der Luft zu einer glasigen Masse eintrocknet; wenn man diese unter eine Glasglocke bringt, deren Innenwände mit Wasser befeuchtet sind, so erstarrt sie im Laufe einiger Wochen zu einem Gemenge, welches aus äußerst kleinen Kriställchen und den beiden nicht kristallisierenden Camphoglykuronsäuren besteht.

Der Kristallbrei wird auf Fließpapier ausgebreitet, unter eine feuchte Glocke gebracht und die auf dem Papier zurückbleibende α-Camphoglykuronsäure durch Umkristallisieren aus heißem Wasser gereinigt.

Leichter erhält man diese Säure aus dem Silbersalz, indem man das ursprüngliche Säuregemisch mit Silberoxyd neutralisiert und die Lösung von den sich ausscheidenden schmierigen Massen abfiltriert. Aus dem Filtrat kristallisieren beim Stehen die Silbersalze der beiden N-freien Camphoglykuronsäuren aus, oft allerdings erst nach längerem Stehen der konzentrierten Lösung, wobei eine teilweise Zersetzung unter Reduktion von Silber sich bemerkbar macht.

Das α-Camphoglykuronsäuresilber ist in Wasser etwas schwerer löslich als das Salz der β-Modifikation und scheidet sich daher zuerst aus. Dieser Anteil der Silbersalze liefert beim Zersetzen mit Salzsäure oder Schwefelwasserstoff vorzugsweise α-Camphoglykuronsäure. Sie bildet nach dem Umkristallisieren eine schneeweiße, etwas wachsartig glänzende Masse, welche aus kleinen, dünnen, häufig drüsenartig zusammenhängenden, eckigen Kriställchen besteht; sie löst sich in etwa 16—20 Teilen Wasser von gewöhnlicher Temperatur, sehr leicht in Alkohol und warmem Wasser, nicht in Äther.

Kupferoxyd wird von ihr in Gegenwart von Alkalien in Lösung erhalten, aber selbst beim stärksten Kochen nicht reduziert.

Die bloß über Schwefelsäure getrocknete Substanz hat die Zusammensetzung $C_{16}H_{24}O_8 + H_2O$.

Im Luftbad verliert die Substanz bei 100° nur sehr schwer ihr Kristallwasser; längeres Erhitzen bis 110° bewirkt Bräunung. Die wasserfreie Substanz schmilzt bei 128—130°.

Zur Darstellung der β-Camphoglykuronsäure diente der im Wasser etwas leichter lösliche Anteil der Silbersalze, welcher durch Umkristallisieren gereinigt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt wurde. Beim Eindampfen im Exsikkator wurde ein gelbgefärbter Sirup erhalten, der zu einer spröden und leicht zerreibbaren Masse austrocknete, an der Luft glasartig durchsichtig wurde, ohne zu zerfließen. Sie zeigte die gleiche Zusammensetzung wie die isomere kristallinische Säure.

Wenn man die Camphoglykuronsäure in einer wässerigen Lösung kocht, welche 4—6% Schwefel- oder Salzsäure enthält, so beginnt die Spaltung sehr bald, schreitet aber sehr langsam fort, wobei die sich abspaltende Glykuronsäure eine Zersetzung erfährt. Der andere Bestandteil, das Campherol, wird aus der Lösung durch Ausschütteln mit Äther entfernt. Die Reinigung des rohen Campherols geschieht in der Weise, daß

man die ätherische Lösung desselben mit Kalilauge schüttelt, den Äther abgießt, mit Wasser wäscht und abdestilliert. Das rückständige, meist noch gelblich gefärbte Campherol wird sodann mit viel Wasser gelöst und durch Verdunsten des Lösungsmittels in kristallinischer Form erhalten. Es hat die Zusammensetzung: $C_8H_{14}\left\{\begin{array}{l}CH.OH\\ CO\end{array}\right.$ und dreht die Ebene des polarisierenden Lichtes nach **rechts**, Sp. 197—198°.

Es ist ähnlich wie das Borneol ein sekundärer Alkohol.

Erst mehrere Jahre später sind die Untersuchungen über Stoffwechselprodukte von Verbindungen der Campherreihe von anderer Seite [1]) wieder aufgenommen worden. Wenn es auf die Gewinnung der gepaarten Glykuronsäuren selbst ankam, wurden die Kaninchen mit Hafer gefüttert, weil in diesem Falle ein ziemlich konzentrierter natürlich saurer Harn gewonnen wurde. Neutralisiert man diesen Harn mit Ätzbaryt, filtriert und setzt zu dem Filtrat neutrales Bleiacetat, so enthält die geringe Fällung kaum die gesuchten Verbindungen. Der basische Bleiniederschlag wird mit destilliertem Wasser gut ausgewaschen, in Wasser suspendiert und mit $SH_2$ behandelt. Man filtriert vom Bleisulfid ab und engt das Filtrat bei höchstens 40° ein. Keine der so dargestellten freien gepaarten Glykuronsäuren zeigt Neigung zum Kristallisieren.

Der nach Darreichung von **Thujon** (Tanaceton) vom Kaninchen gelassene saure Harn wurde mit Barytwasser neutralisiert, das Filtrat mit neutralem Bleiacetat versetzt, bis kein Niederschlag mehr kam, das nunmehr erhaltene Filtrat mit basischem Bleiacetat ausgefällt und der Niederschlag mit heißem destillierten Wasser mehrmals ausgewaschen. Der Niederschlag wurde mit $SH_2$ entbleit und die vom Schwefelblei abfiltrierte Lösung bei 45° auf dem Wasserbade eingeengt, mit Tierkohle behandelt und mit verdünnter Kalilauge schließlich neutralisiert: im Vakuum über Schwefelsäure scheidet sich das Kalisalz der **Thujonhydratglykuronsäure** aus. Die **wässerige Lösung** dreht stark nach **rechts**, jedoch nicht so stark als Thujon selbst. Die Eigenschaft der gepaarten Glykuronsäure, nach links zu drehen, ist auch hier erhalten, doch ist die Linksdrehung nur eine relative, insofern die Eigendrehung des Paarlings vermindert wurde. Die Eigenschaft einer Substanz, nach rechts zu drehen, spricht demnach nur dann gegen eine gepaarte Glykuronsäure, wenn man für den Paarling keine größere Rechtsdrehung konstatieren kann.

Die mit basischem Bleiacetat erhaltenen Niederschläge wurden sorgfältig mit verdünnter Schwefelsäure verrieben und vom schwefelsauren Blei

[1]) *H. Hildebrandt,* Über Synthesen im Tierkörper. (2.) Verbindungen der Kampfergruppe. Arch. f. exp. Pharm. Bd. **45**. S. 111 (1901). — *H. Hildebrandt,* Weiteres über Citral, über seine Oxydationsprodukte im Tierkörper sowie über einige zyklische Isomere. Arch. f. exp. Pharm. Bd. **46**. S. 261 (1901). — Mit *E. Fromm,* Über das Schicksal zyklischer Terpene und Kampfer im tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **33**. S. 579 (1901); Bd. **37**. S. 189 (1903). — *H. Hildebrandt,* Über das Verhalten von Carvon und Santalol im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **36**. S. 441 (1903).

durch Absaugen befreit. Das so gewonnene Filtrat enthielt nun neben überschüssiger Schwefelsäure und der gesuchten gepaarten Glykuronsäure als wesentliche Verunreinigungen nur noch Essigsäure und geringe Mengen freier Glykuronsäure. Man kann nun die schwefelsaure Lösung entweder mit Äther erschöpfen, wobei in den Äther in der Hauptsache nur gepaarte Glykuronsäuren und Essigsäure übergehen; in diesem Falle wird der aus dem Äther gewonnene Rückstand im Vakuum über Natronkalk von der Essigsäure befreit. In dieser Weise kann man die Borneolglykuronsäure[1] gewinnen, eventuell über ihr Zinksalz, aus dem sich nach Zusatz von Schwefelsäure die Borneolglykuronsäure ausscheidet, Sp. 174—175°.

Man kann aber auch die schwefelsaure Lösung mit Bariumkarbonat neutralisieren, vom Bariumsulfat abfiltrieren, das Filtrat, welches die Bariumsalze der Essigsäure, der gepaarten Glykuronsäure und etwas freie Glykuronsäure enthält, durch Destillation im Vakuum konzentrierten und den Rückstand durch sukzessive Behandlung mit Äther und Alkohol in die einzelnen Salze zerlegen.

Werden im Falle der Mentholglykuronsäure die so gewonnenen wässerigen Lösungen der Bariumsalze im Vakuum konzentriert und die konzentrierte Lösung mit Alkohol versetzt, so entsteht ein Niederschlag einer in Alkohol schwer löslichen Substanz, welche zum Teile freie Glykuronsäure ist, da sie *Fehling*sche Lösung reduziert, außerdem essigsaures Barium, dessen konzentrierte Lösung durch starken Alkohol gefällt wird. Die alkoholische Lösung ergibt beim Zusatz von Äther oder Aceton einen zweiten Niederschlag einer in diesen Lösungsmitteln schwer löslichen Substanz, welche weitaus die größte ist und fast ausschließlich die gepaarten Glykuronsäuren enthält. Wird die konzentrierte Lösung dieses Bariumsalzes mit Cadmiumchlorid bis zur bleibenden Trübung versetzt, so scheidet sich nach einigem Stehen das mentholglykuronsaure Cadmium aus, welches in ansehnlichen weißen Nadeln kristallisiert. Der mit Schwefelsäure versetzten Lösung dieses Salzes entzieht Äther die freie Mentholglykuronsäure $C_{16}H_{28}O_7$, welche sich aus siedendem Wasser umkristallisieren läßt, Sp. 87—88°; ihr Spaltungsprodukt ist Menthol.

Arbeitet man mit solchen Glykuronsäureverbindungen, welche gegenüber Mineralsäuren auch in der Kälte empfindlich sind, so empfiehlt es sich, das basische Bleisalz mit einer Bariumsulfid-Lösung umzusetzen, wodurch das Blei als Sulfid abgeschieden wird, und Glykuronsäureverbindungen sowohl wie auch Salzsäure — die im basischen Bleiniederschlage als Bleichlorid enthalten ist — gehen als Bariumsalze in Lösung. Beim Konzentrieren der Lösung der Bariumsalze im Vakuum scheidet sich ein großer Teil des Chlorbariums kristallisiert aus und kann abfiltriert werden. Weitere Mengen von Chlorbarium können durch wieder-

[1]) *E. Fromm* und *P. Clemens*, Über das Schicksal zyklischer Terpene und Kampfer im tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34. S. 385 (1901). — *H. Hildebrandt*, Oxydation des Borneolglykosides auf biochemischem Wege. Biochem. Zeitschr. Bd. 21. S. 1 (1909). — *J. Hämäläinen*, l. c.

holtes fraktioniertes Fällen der konzentrierten Lösung mit Alkohol oder Aceton entfernt werden. Die immer wieder im Vakuum konzentrierten Mutterlaugen vom Chlorbarium scheiden endlich Barytsalz aus, welches die gepaarte Glykuronsäure enthält. Weitere Mengen dieses Bariumsalzes gewinnt man eventuell aus den Mutterlaugen durch Aussalzen mittelst Kochsalzes.

Gelingt es auch dann nicht, ein kristallisiertes Bariumsalz zu gewinnen, so empfiehlt es sich, den Versuch mit dem durch Umsetzung mittelst Kaliumsulfat zu gewinnenden Kalisalze zu machen. Die vom schwefelsauren Baryt abfiltrierte Lösung wird eingedampft, im Vakuum völlig getrocknet und nunmehr mit siedendem absoluten Alkohol extrahiert. In besonders reichen Mengen erhält man ein derartiges Kalisalz nach Darreichung des Terpens **Camphen** [1]), aber auch zur Gewinnung der Stoffwechselprodukte von **Santalol** erwies sich dieses Verfahren als geeignet. Man kann die wässerige Lösung des gewonnenen Kalisalzes von neuem dem Bleiverfahren unterwerfen und gewinnt dann in Form basischer Bleisalze neues Material.

Aus der Zusammensetzung der so erhaltenen Bleisalze [1]) konnte ermittelt werden, daß bei gewissen Verbindungen der Kampferreihe die im Harne erscheinenden Derivate keine einheitliche Zusammensetzung haben.

Die Untersuchung des nach Darreichung von Camphen erhaltenen Kalisalzes führte zu einer Säure $C_{16}H_{26}O_8$, welcher ein Camphenderivat $C_{10}H_{18}O_2$ zugrunde liegt, das in Camphenilanaldehyd $C_{10}H_{16}O$ und Wasser [2]) zerfällt.

Wenn beabsichtigt wurde, nicht die gepaarten Glykuronsäuren selbst, sondern deren Spaltungsprodukte zu gewinnen, wurden die Kaninchen mit frischen Kohlblättern gefüttert, weil sie in diesem Falle größere Mengen der dargereichten Substanzen vertragen. Der so gewonnene Harn wird bis zur deutlich sauren Reaktion mit starker Salzsäure versetzt und entweder direkt oder mit gespanntem Dampf destilliert. Auf dem wässerigen Destillate sammeln sich in allen Fällen ölige Schichten, welche die Spaltungsprodukte darstellen. Jedes dieser Spaltungsprodukte wird abgehoben und zunächst mit Alkali geschüttelt, um so die Phenole zu entfernen. Durch Ansäuern der alkalischen Lösung können diese Phenole gewonnen werden: sie wurden kristallinisch erhalten aus den nach Darreichung von **Limonen** und **Phellandren** gewonnenen Destillaten. Der in Alkali unlösliche Teil eines jeden Spaltungsproduktes wird nun zunächst direkt fraktioniert. Hierbei zeigt sich alsbald schon durch den Siedepunkt der Hauptmenge, ob im wesentlichen ein Kohlenwasserstoff, Cymol, oder ein Isomeres

[1]) *H. Hildebrandt*, Über das Schicksal einiger zyklischer Terpene und Kampfer im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **36**. S. 454 (1902).

[2]) *E. Fromm, H. Hildebrandt* und *P. Clemens*, Über das Schicksal zyklischer Terpene und Kampfer im tierischen Organismus. (Über das Verhalten des Camphens im Tierkörper.) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **37**. S. 189 (1902).

des **Kampfers** vorliegt, da die Verbindungen $C_{10}H_{14}$ ungefähr bei 170 bis 180°, die Verbindungen $C_{10}H_{16}O$ ungefähr bei 200—220° sieden. Man muß natürlich jedes dieser Produkte wiederholt, die Kohlenwasserstoffe zuletzt über Natrium destillieren, um sie frei von Produkten und Farbstoffen, welche stets zugegen sind, zu erhalten.

Will man die Oxydationsprodukte der gepaarten Glykuronsäuren näher untersuchen, so kann man den gewonnenen Harn direkt mit Permanganatlösung versetzen, und zwar so lange, bis die Rotfärbung über Nacht bestehen bleibt. Man entfärbt, filtriert vom Manganschlamm ab, wäscht diesen mit sodahaltigem Wasser nach und konzentriert die alkalischen Filtrate auf dem Wasserbade. Die klare konzentrierte Lösung wird mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther erschöpft. Der Äther hinterläßt die sauren Oxydationsprodukte in Form eines Öles, aus welchem sich Kristalle abscheiden, welche durch Absaugen gewonnen werden. Nimmt man den öligen Anteil der Säuren in Alkali auf, so entfärbt die alkalische Lösung abermals Permanganat; in dieser Weise gelingt es, weitere Mengen der kristallisierten Säuren zu gewinnen.

So wurde der Nachweis geführt, daß Sabinen und der entsprechende Alkohol **Sabinol** im Organismus verschiedene gepaarte Verbindungen liefern, woraus folgt, das beim **Sabinen** im Organismus die Oxydation an einer anderen Stelle erfolgen muß.

Um festzustellen, ob ein durch die Spaltung der gepaarten Verbindung erzeugter Kohlenwasserstoff **Paracymol** ist, muß der Nachweis geführt werden, daß durch Oxydation mit Permanganat p-Oxyisopropylbenzoesäure, Sp. 155—156°, entsteht, oder daß nach Verfütterung Cuminsäure ausgeschieden wird.

Letztere Methode ist auch geeignet, um eine Darreichung von Sadebaumöl[1]) aus dem Harn nachzuweisen; der Harn wird mit Schwefelsäure versetzt und destilliert; das auf dem Destillate schwimmende Öl wird abgehoben und einem Kaninchen innerlich eingegeben. Der tags darauf von diesem gelassene Harn wird am Rückflußkühler nach Zusatz von Schwefelsäure gekocht; nach dem Abkühlen wird die Flüssigkeit alkalisch gemacht und destilliert, wobei die Cuminsäure als Alkalisalz zurückbleibt. Dann wird sauer gemacht und nochmals destilliert: Cuminsäure.

Der Alkohol **Geraniol** geht ebenso wie der zugehörige Aldehyd **Citral** im Kaninchenorganismus über in die der Bernsteinsäurereihe angehörige zweibasische Säure[2]), welche im basischen Bleiniederschlag des Harns enthalten ist; wird dieser durch Schwefelwasserstoff zerlegt und warm filtriert, so scheidet sich die Säure direkt kristallinisch aus. Das isomere **Nerol** dagegen liefert diese Säure nicht, so daß für dieses eine andere Konstitution anzunehmen ist.

---

[1]) *H. Hildebrandt*, Sabinol, der Terpenalkohol des Oleum Sabinae. Arch. f. exp. Pharm. Bd. 45. S. 111 (1901). — Zur gerichtsärztlichen Kenntnis des Sadebaumöles. 17. Hauptversammlung des Preuß. Medizinalbeamtenvereines. Berlin 1900.

[2]) *H. Hildebrandt*, Über das biologische Verhalten von Nerol, Geraniol, Cyclogeraniol. Beitr. z. chem. Physiol. Bd. 4. S. 251 (1903).

Der nach Darreichung des **Terpineol**, Sp. 32°[1]), vom Kaninchen gelassene Harn wurde mit neutralem Bleiacetat ausgefällt und das Filtrat mit Bleiessig versetzt, bis kein Niederschlag mehr kam: der Niederschlag wurde wiederholt mit destilliertem Wasser ausgewaschen und dann mittelst verdünnter Schwefelsäure zersetzt, das Filtrat vom schwefelsauren Blei wird unter beständigem Rühren mit einem Überschuß von Bariumkarbonat auf dem Wasserbade erwärmt, wobei kein ätherischer Geruch auftritt. Im Filtrat wurde mittelst Kaliumsulfats das Barium durch Kalium ersetzt; aus der filtrierten Kaliumsalzlösung schieden sich beim vorsichtigen Einengen kristallinische Massen aus, die umkristallisiert wurden. Aus dem Kaliumsalz wurde das Bariumsalz dadurch hergestellt, daß die Lösung mit Schwefelsäure versetzt und dann mit Essigäther ausgeschüttelt wurde: die ätherische Lösung wurde unter Zusatz von Bariumkarbonat abdestilliert, der Rückstand mit destilliertem Wasser versetzt und durch vorsichtiges Einengen schneeweiße Kristalle des Bariumsalzes gewonnen. Die freie Säure wurde aus dem Bariumsalze durch vorsichtiges Ausfällen des Bariums mittelst verdünnter Schwefelsäure und vorsichtiges Einengen des Filtrats gewonnen. Die Kristallisation erfolgte erst beim Reiben mit dem Glasstab auf Zusatz von Alkohol. Die freie Säure bildete feine weiße Nadeln, Sp. 110—119°. Beim Erwärmen mit verdünnter Schwefelsäure trübt sich die vorher klare Lösung und es tritt der charakteristische Geruch des Terpinols, Sp. 32°, auf: Terpineolglykuronsäure.

Die **Terpineol-35-**Glykuronsäure kristallisiert als Kalisalz schwerer; zum Zwecke ihrer Darstellung wurde das schwefelsaure Filtrat mit Essigäther ausgeschüttelt und durch Verdunsten dieses das Bariumsalz dargestellt und daraus die freie Säure gewonnen, Sp. 104—110°.

Nach Darreichung des **p-Dimethylamino-benzaldehyds**[2]) am Kaninchen wird der Harn in der üblichen Weise nach dem Bleiverfahren verarbeitet; im Bleiniederschlag findet sich reichlich eine gepaarte Glykuronsäure, während durch Ammoniak vorwiegend eine zweite linksdrehende Verbindung gefällt wird. Die Bleiessigniederschläge wurden nach sorgfältigem Auswaschen mit $SH_2$ zerlegt, filtriert und mit kaltem Wasser ausgewaschen. Mittelst Essigäther wurde hieraus die Mono-methyl-amidobenzoesäure isoliert.

Der voluminöse Schwefelbleirückstand wird mehrmals mit größeren Mengen Wasser ausgekocht und heiß filtriert. Das meist schön himbeerrot gefärbte Filtrat erstarrt beim Erkalten zu einem Kristallbrei, der von der roten Mutterlauge durch Filtration getrennt, eine farblose, silberglänzende Masse darstellt. Nach einmaligem Umkristallisieren aus kochendem Wasser oder Alkohol war die Verbindung analysenrein: Dimethylamino-

[1]) *R. Matzel*, Zur Pharmakologie der ätherischen Öle. Archiv Int. de Pharmacodynamie et de Thérapie. Bd. **14**. S. 331 (1905).

[2]) *M Jaffe*, Über das Verhalten des p-Dimethylaminobenzaldehyds im tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **43**. S. 374 (1904).

benzoeglykuronsäure, $C_{15}H_{19}NO_8$; sie hat die Eigenschaft, Kupferoxyd in alkalischer Lösung beim Erwärmen zu reduzieren; ihre rechtsdrehende Eigenschaft ist anscheinend durch leichte Spaltung bedingt, da Lösungen in verdünnten Mineralsäuren nach links drehen.

Im neutralen Bleiniederschlag findet sich p-Dimethylaminobenzoesäure, welche nach Zersetzung mittelst $SH_2$ durch Auskochen mit Wasser und Alkohol gewonnen, ins Bariumsalz übergeführt und mit Essigsäure gefällt wird.

Nach Darreichung der **p-Dimethylamino-benzoesäure**[1]) erhält man in reichlichen Mengen die nach Darreichung des Aldehyds gewonnene Glykuronsäureverbindung.

Eine **Benzoesäure-**Glykuronsäure[2])-Verbindung wurde aus dem Harn von Hammeln nach Fütterung von Benzoesäure gewonnen. Der stark alkalisch reagierende Harn wurde mit Essigsäure soweit angesäuert, bis eine Probe, auch nach dem Kochen, d. h. nach Austreibung der $CO_2$, schwach sauer oder neutral blieb. Die Ansäuerung erfolgt am besten in jeder halbtägigen Portion, um Zersetzung zu vermeiden. Der unter Toluol aufgefangene Harn von 3—4 Tagen wird nunmehr in einem großen Gefäß zuerst mit essigsaurem Baryt, dann mit neutralem Bleiacetat vollständig ausgefällt, nach 24 Stunden in einer Probe der noch verbleibende Salzsäuregehalt ermittelt und die Reste dieser Säure mit der berechneten Menge Silbernitrat genau ausgefällt. Erst nach Absetzung der Silberfällung wird scharf abgenutscht, 2—3mal mit wenig Wasser gewaschen. Das Filtrat ist so gut wie frei von Mineralsäuren; es wird mit Bleiessig vollständig ausgefällt, der massige Niederschlag auf einer Nutsche 6—10mal mit viel Wasser gewaschen, bis das Waschwasser nur noch ganz geringe Mengen Blei enthält. Der Bleiessigniederschlag wird in einer großen Pulverflasche mit Glasstopfen auf der Schüttelmaschine zerkleinert, dann unter Benutzung eines mechanischen Rührers durch Schwefelwasserstoff zerlegt, vom Schwefelblei abgesaugt, das klare Filtrat wird auf Schwefelsäure, herrührend von einer Oxydation des $SH_2$ beim Filtrieren, geprüft, eventuell entsprechende Mengen Barytwasser zugegeben. Das Filtrat wird im Vakuum unter 40° auf $^1/_2$—$^3/_4$ *l* eingeengt; es fallen von den darin gelösten Mengen Hippursäure und Benzoesäure geringe Anteile aus, da die gepaarte Glykuronsäure größere Mengen in Lösung erhält. Diese Lösung wird so oft mit Petroläther geschüttelt, bis dieser keine Benzoesäure mehr aufnimmt; die nunmehr erforderliche, fraktionierte Ausziehung mit Äther wird in dem kontinuierlich wirkenden Apparat von *Zelmanowitz*[3]) vorgenommen und

---

[1]) *H. Hildebrandt*, Über das Verhalten der Toluidine im tierischen Organismus. Beitr. z. chem. Physiol. Bd. 7. S. 433 (1905).

[2]) *A. Magnus-Levy*, Über das Auftreten einer Benzoesäure-Glykuronsäureverbindung im Hammelharn nach Benzoesäurefütterung. Biochem. Zeitschr. Bd. 6. S. 502 (1907).

[3]) *C. Zelmanowitz*, Über einen neuen Apparat zur Extraktion wässeriger Flüssigkeiten mittelst Äther, Ligroin usw. Biochem. Zeitschr. Bd. 1. S. 253 (1906).

tagelang fortgesetzt. Aus der schließlich erhaltenen wässerigen Lösung der gepaarten Verbindung läßt sich das Strychninsalz kristallinisch gewinnen. Es wird der Säuregrad der wässerigen Lösung titrimetrisch ermittelt, die berechnete Menge Strychnin in heißem Alkohol gelöst und nach mäßigem Abkühlen zu der Lösung der Säure gegossen. Dann wird im Vakuum bis zur Entfernung des Alkohols eingeengt, mit Chloroform überschüssiges Strychnin ausgeschüttelt und wiederum im Schwefelsäureexsikkator eingeengt, eventuell mit vorrätigen Kristallen geimpft: nach 24 Stunden wird der Kristallbrei abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen. Das 2- bis 3malige Umkristallisieren zuerst aus Wasser, dann aus größeren Mengen 60—80%igem Alkohol muß ebenfalls bei gelinder Wärme vorgenommen werden, wobei aber eine geringe Spaltung der gepaarten Verbindung sich nicht vermeiden läßt.

Das benzoylglykuronsaure Strychnin, $C_{34}H_{36}N_2O_{10} + 2(?)H_2O$, Sp. 162°, besteht aus schönen, weißen Kristallen in gut ausgebildeten rhombischen Säulen und Platten. Bei der Spaltung mit Kalilauge liefert die Substanz ca. 19% Benzoesäure, wenn man nach der Ansäuerung mit Petroläther extrahiert. Aus dem Strychninsalz stellt man das Natriumsalz her durch Zusatz der berechneten Menge $^1/_5$-Normalnatronlauge zur wässerigen Lösung, das sich abscheidende Strychnin wird abgesaugt und der Rest mittelst Chloroform entfernt. Durch Behandeln der eingeengten Lösung mit Alkohol und Äther gewinnt man das Natriumsalz als weißen, lockeren Niederschlag, der im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wird. Seine spez. Drehung ist + 43·86°. Die starke Rechtsdrehung bleibt auch bei Zusatz von 5—10%iger Schwefelsäure bestehen im Gegensatz zu dem Verhalten der Dimethylaminobenzoeglykuronsäure, die in mineralsaurer Lösung deutlich links dreht. 5stündiges Erhitzen der schwefelsauren Lösung vermindert die Drehung um fast die Hälfte. Die Lösung der Säure oder ihres Natriumsalzes in Wasser schmeckt nicht süß.

Die Anwesenheit der Benzoylglykuronsäure im Harn ist wahrscheinlich, wenn der Harn stark nach rechts dreht, reduziert, ein Osazon gibt und nicht gärt; ferner wenn man nach der Behandlung des Harns mit Bleiessig und Zerlegung dieses Niederschlages mit $SH_2$ die Lösung mittelst Petroläthers von Benzoesäure befreit hat und dann eine Lösung gewinnt, die wesentlich mehr gebundene Benzoesäure enthält, als der in der Lösung befindlichen Hippursäure entspricht. Die Maximalmenge der Hippursäure kann durch Analyse des N-Gehaltes der Lösung ermittelt werden.

Nach Darreichung von **Phenanthren**[1]) hatten bereits *Pschorr* und *Bergell* das Bleisalz der Phenanthrenglykuronsäure erhalten; sie gewannen daraus mittelst der Zinkstaubdestillation das Phenanthrol.

[1]) *Pschorr* und *Bergell*, Über die physiologische Wirkung einiger Phenanthrenderivate. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 38. S. 18 (1903).

Zur Darstellung der reinen Phenanthrolglykuronsäure[1]) zersetzt man das Bleisalz mit Schwefelsäure, äthert mit Essigäther aus, destilliert unter Zusatz von trockenem Bariumkarbonat, nimmt den Rückstand mit heißem Wasser auf und filtriert ab; es scheidet sich das Bariumsalz der gepaarten Glykuronsäure ab, welches man mittelst Schwefelsäure in die freie Säure überführen kann.

Die nach Verfütterung hydrierter Phenanthrene in gleicher Weise zu erhaltenden Bariumsalze scheiden sich wegen ihrer leichteren Löslichkeit in Wasser weniger leicht ab.

Im Anschluß an die Methoden zur Gewinnung der mit Glykuronsäure gepaarten Verbindungen seien einige weitere Paarungen andersartiger Natur erwähnt.

Der nach Darreichung von **Brom-Benzol**[2]) an Hunde gewonnene Harn wird mit $^{1}/_{20}$ Volumen Bleiacetatlösung vermischt, filtriert, mit $^{1}/_{10}$ Volumen konzentrierter Salzsäure versetzt und nach 8—10 Tagen von dem ausgeschiedenen Niederschlag getrennt; dieser besteht aus unreiner Bromphenylmerkaptursäure, einem indifferenten, schwefel-, brom- und stickstoffhaltigen Körper, Schwefel, Kynurensäure, Harnsäure und gefärbten Produkten. Durch zweimaliges Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle wurden farblose Kristalle erhalten, deren Lösung in wenig Alkohol in heißes Wasser gegossen wird; beim Erkalten wird die Bromphenylmerkaptursäure in zollangen Nadeln und Spießen abgeschieden, $C_{11}H_{12}BrSNO_3$, eine einbasische Säure, bei deren Spaltung mit Schwefelsäure Essigsäure erhalten wurde und ein Spaltungsprodukt, das vom Cystin, $C_3H_7SNO_2$, sich dadurch ableitet, daß ein H durch die Gruppe $C_6H_4Br$ ersetzt wird, Bromphenylcystin. Dieses Spaltungsprodukt wird gewonnen, indem man nach der Spaltung die noch warme Lösung in das 6fache Volumen Wasser gießt, mit Ammoniak beinahe neutralisiert und mit Ammoniumkarbonat schwach übersättigt. Die Essigsäure wurde als Silbersalz dargestellt, beim Kochen mit Alkalien entstand Bromphenylmerkaptan und Ammoniak.

Der nach Darreichung von **Furfurol**[3]) erhaltene Harn wird abgedampft, mit Alkohol extrahiert, nach dem Verdunsten des Alkohols mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Aus dem Äther scheiden sich aus (in kleinen Mengen) Brenzschleimsäure, (in großen Mengen) ihr Glykokollderivat, Pyromycursäure, Sp. 165°.

Zur Gewinnung von Furfuracrylursäure (Sp. 213—215°), $C_4H_3O.CH = CH.CO.NH.CH_2COOH$, füttert man Hunde ausschließlich mit Brot

---

[1]) *H. Hildebrandt*, Zur Pharmakologie des Phenanthrens und seiner Hydroderivate. Arch. f. experim. Pharm. Bd. 59. S. 140 (1908).

[2]) *E. Baumann* und *C. Preuße*, Zur Kenntnis der synthetischen Prozesse im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 5. S. 309 (1881).

[3]) *M. Jaffé* und *R. Cohn*, Über das Verhalten des Furfurols im tierischen Organismus. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Bd. 20. S. 2311 (1887).

und Milch und gibt Furfurol subkutan. Die Ätherauszüge des Harns werden stark konzentriert und eventuell völlig verdunstet, der Rückstand wird mit kaltem Wasser zur Entfernung der Brenzschleimsäure usw. behandelt und dann mehrmals aus kochendem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Kocht man die Säure 6—8 Stunden mit starkem Barytwasser, so zerfällt sie ohne Farbenveränderung in Glykokoll und Furfuracrylsäure. Sp. 140°.

Zur Darstellung des Stoffwechselproduktes von **Pyridin**[1]) wurde der mit Bleiessig und Ammoniak ausgefällte Hundeharn mittelst Schwefelsäure entbleit und nach dem Filtrieren vom schwefelsauren Blei mit Kaliumquecksilberjodidlösung versetzt. Es entstand ein dichtflockiger Niederschlag, bei längerem Stehen weitere Ausscheidung in Form glänzender Kristallblättchen. Der auf dem Filter gesammelte und ausgewaschene Niederschlag wird unter Zusatz von Schwefelsäure durch Silberoxyd zersetzt. Nach Abfiltrieren vom Jodsilber findet sich im Filtrat die Base neben überschüssiger Schwefelsäure und Silbersulfat. Die letzteren wurden durch Barytwasser niedergeschlagen, filtriert, der überschüssige Baryt durch Einleiten von Kohlensäure und Erwärmen entfernt und die wässerige Lösung mit Salzsäure genau neutralisiert. Nach Eindampfen, mehrmaligem Ausziehen mit Alkohol und Wiedereindampfen hinterblieb ein sirupförmiges, durch Verunreinigungen bräunlich gefärbtes Salz der Base. Aus der alkoholischen Lösung dieses salzsauren Salzes wurde durch Platinchlorid das Doppelsalz der Base als brauner, dichter Niederschlag gefällt, der in heißem Wasser unter Hinterlassung der amorphen Verunreinigungen leicht löslich war und nach dem Einengen der Lösung gut auskristallisierte. $C_{12}H_{16}N_2Cl_2 + PtCl_4$.

Aus dem Platindoppelsalz wurde durch Zersetzung mit Chlorkalium, Eindampfen und Ausziehen mit Alkohol das Hydrochlorid der Base gewonnen und diese selbst durch Zersetzen mit Silberoxyd: Methyl-Pyridylammoniumhydroxyd, $OH . CH_3 — NC_5H_5$.

An Stelle des Kaliumquecksilberjodids läßt sich zur Fällung der Base auch Phosphorwolframsäure verwenden. Der ausgewaschene Niederschlag wird durch Zusammenrühren mit Ätzbaryt zersetzt, filtriert, aus dem Filtrat durch Einleiten von Kohlensäure und Erwärmen der überschüssige Baryt entfernt, die alkalische Flüssigkeit durch Salzsäure genau neutralisiert und dann bei gelinder Wärme eingedampft; der Rückstand enthält Kreatin, das in Alkohol ungelöst bleibt. Die alkoholische Lösung wird eingedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, mit Schwefelsäure angesäuert und zum zweiten Male mit Phosphorwolframsäure gefällt, die Fällung wie oben angegeben behandelt. Nach Verdunsten der alkoholischen Lösung hinterbleiben die Basen in Form eines in Wasser und Alkohol leicht löslichen Sirups, aus dem durch Platinchlorid das Doppelsalz der Base gefällt wurde.

[1]) *W. His*, Über das Stoffwechselprodukt des Pyridins. Arch. f. experim. Pharm. Bd. 22. S. 253 (1887).

## Veränderungen am Molekül durch Oxydation resp. Reduktion.

Der nach Darreichung von **Benzamid**[1]) gewonnene Harn wird zur Sirupdicke eingedampft und mit Alkohol gefällt; der Rückstand nach dem Verdunsten des alkoholischen Filtrates wird mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Der abdestillierte Äther hinterließ eine kristallinische Masse, die unter dem Mikroskop die für die Hippursäure charakteristischen monoklinen Prismen zeigte. Benzamid wird in den alkalischen Säften unter Aufnahme von Wasser in Ammoniak und Benzoesäure gespalten, welch letztere dann als Hippursäure ausgeschieden wird. Dagegen **Acetamid**[2]) verläßt den Organismus unverändert. Es konnte keine freie Essigsäure nachgewiesen werden. Bei Destillation des Harns mit Schwefelsäure ging ein stark saures Destillat über, ein Teil davon wurde mit kohlensaurem Natrium neutralisiert, auf ein kleines Volumen verdunstet und mit Silbernitrat versetzt. Der sofort entstehende weiße Niederschlag wurde aus heißem Wasser umkristallisiert: essigsaures Silber, entstanden aus Acetamid, welches ja beim Erhitzen mit Säuren und Alkalien leicht in Essigsäure und Ammoniak zerfällt.

Der nach **Salicylamid**[3]) $C_6H_4 \genfrac{}{}{0pt}{}{OH}{CONH_2}$ gelassene Harn wurde mit Schwefelsäure zur Zerlegung der gepaarten Säuren erwärmt, hierauf mit kohlensaurem Baryt von der Schwefelsäure befreit; aus der nun abfiltrierten Lösung kristallisierten nach dem Eindampfen lange Nadeln, die als Salicylamid erkannt wurden.

Nach Darreichung von **Acetanilid**[4]) bei Hunden und Kaninchen wird ein linksdrehender Harn entleert, der im Falle des Kaninchens auch deutlich reduziert. Die Urine wurden abgedampft, mit Alkohol extrahiert und die Alkoholextrakte verdampft, der Rückstand mit Wasser und konzentrierter Salzsäure aufgenommen und am aufsteigenden Kühler einige Stunden gekocht. Nach dem Abkühlen wurde zunächst die saure Lösung 3mal mit Äther extrahiert, später durch Zusatz von Kalilauge alkalisch gemacht und ebenfalls mit Äther extrahiert; durch die Extraktion aus saurer Lösung wurde bei Hundeharn o-Oxycarbanil gewonnen, welches dadurch entsteht, daß Acetanilid durch Oxydation der Acetylgruppe übergeht in Oxyphenylcarbaminsäure, die unter Wasseraustritt sich

[1]) *L. v. Nencki*, Über das Verhalten einiger aromatischer Verbindungen im Tierkörper. Arch. f. exp. Pharm. Bd. **1**. S. 420 (1873).

[2]) *Schulzen* und *Nencki*, Die Vorstufen des Harnstoffes im tierischen Organismus. Zeitschr. f. Biol. Bd. 8. S. 124 (1872). — *E. Salkowski*, Über den Vorgang der Harnstoffbildung im Tierkörper und den Einfluß der Ammoniaksalze. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **1**. S. 38 (1877).

[3]) *Baumann* und *Herter*, Über die Synthese von Ätherschwefelsäuren und das Verhalten einiger aromatischer Substanzen im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **1**. S. 255 (1877).

[4]) *M. Jaffé* und *P. Hilbert*, Über Acetanilid und Acettoluid und ihr Verhalten im tierischen Stoffwechsel. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **12**. S. 295 (1868).

in jene Verbindung umlagert. Aus der alkalischen Lösung ließ sich bei beiden Tieren Paraamidophenol gewinnen: Indophenolreaktion (HCl + + Karbolsäure + Chlorkalk: rot; + Ammoniak; tiefblau).

Aus dem Harn nach **Orthoacettoluid** wurde das entsprechende Methyloxycarbanil gewonnen, das beim Erhitzen mit $NH_3$ ein Amidokresol bildete.

Nach Darreichung von Meta- und Para-acettoluid wurden die entsprechenden Acetylamidobenzoesäuren isoliert, welche aus saurer Lösung in Äther gingen. Aus Kaninchenharn fällt die p-Acetylamidobenzoesäure nach Zusatz von konzentrierter Salzsäure direkt.

Alle diejenigen Derivate des **Acetylparaamidophenols** [1]), welche physiologische Wirkungen zeigen, liefern im Organismus Paraamidophenol resp. leicht spaltbare Derivate desselben: Indophenolreaktion. Der zu untersuchende Harn wird mit 1—2 $cm^3$ konzentrierter Salzsäure gekocht; nach dem Erkalten werden 3—5 Tropfen einer gesättigten Phenollösung, 1—2 Tropfen einer Chromsäurelösung zugeführt. Die Flüssigkeit färbt sich alsbald sehr schön rot; ebenso ist der Schaum gefärbt. Tropft man jetzt (konz.) $NH_3$ auf den Schaum, so entsteht sofort an der Berührungsfläche eine prachtvoll blau gefärbte Schicht, die bei gelindem Schütteln nach einiger Zeit dunkel und deutlicher wird. Das Umschlagen der Farbe vom Rot ins Blau ist für die Reaktion charakteristisch.

Aus **Anilin** entsteht nach den Untersuchungen von *Schmiedeberg* im Tierkörper Paraamidophenol, welches die Indophenolreaktion gibt, besonders schön, wenn die Reaktion im alkalischen Ätherextrakt ausgeführt wird. Der Harn wird mit konzentrierter Salzsäure, dann mit Phenol versetzt, mit $F_2Cl_6$ oxydiert und mit $NH_3$ alkalisch gemacht. Filtriert man den sich bildenden roten Niederschlag ab, so färben sich Filter und Filtrat intensiv blau, bei Anwesenheit von nur wenig Paramidophenol blaugrün, auch wenn die Verdünnung 1:1,600.000 beträgt. Da es sich um einen Aminokörper handelt, mußte nach dem Diazotieren mit α-Naphtol in ammoniakalischer Lösung sich ein Farbstoff bilden; wird der Rückstand des alkalischen Ätherextraktes mit verdünnter Salzsäure aufgenommen und mit Natriumnitritlösung diazotiert, mit alkoholischer α-Naphtollösung versetzt, so bildet sich auf Hinzufügen von Ammoniak eine intensiv rote Färbung. Zur Identifizierung kann man durch Acetylierung das Diacetylamidophenol, Sp. 150—151°, darstellen, indem man mit Essigsäureanhydrid den Ätherrückstand am Rückflußkühler kocht, das überflüssige Essigsäureanhydrid abdestilliert, den Rückstand mit Wasser und Tierkohle kocht und dann filtriert; das Filtrat erstarrt kristallinisch und wird aus Benzol umkristallisiert. [2])

[1]) *O. Hinsberg* und *G. Treupel*, Über die physiologische Wirkung des p-Amidophenols und einiger Derivate desselben. Arch. f. exp. Pharm. Bd. **33**. S. 216 (1894).

[2]) *E. Meyer*, Über das Verhalten des Nitrobenzols und einiger anderer aromatischer Nitrokörper im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 497 (1905).

Nach Darreichung von **p-Nitrophenol** nimmt man den Rückstand des sauren Ätherauszuges mit verdünnter Mineralsäure auf und reduziert mit Zink und Salzsäure zu Amidophenol.

Der nach Darreichung von m-Nitrophenol erhaltene Harn wird sauer aufgekocht, der Ätherextrakt aus saurer Lösung färbt sich nach dem Abdampfen und Aufnehmen mit Wasser auf Zusatz von Alkali gelb; das Ausgeschüttelte wird alkalisch gemacht und abermals mit Äther extrahiert, abgedampft, in konzentrierter Schwefelsäure aufgenommen und mit Phthalsäureanhydrid 10 Minuten auf 180—190° erhitzt. Beim Schütteln mit Amylalkohol geht die entstandene Rhodaminbase mit zartroter Farbe und grüner Fluoreszenz in den Amylalkohol über (Metaaminophenolnachweis).

Der **Dimethylorthoamidophenol**[1] enthaltende Harn wird alkalisch gemacht und destilliert, wobei jenes übergeht, wie man an der rotvioletten Färbung mit $F_2Cl_6$ erkennt *(P. Griess)*.

Um nach Darreichung von **Dimethylparatoluidin** diese Reaktion zu erhalten, ist der Harn zuvor mit starker Schwefelsäure am Rückflußkühler zu kochen, zu filtrieren und alkalisch zu destillieren; infolge des Kochens mit Schwefelsäure wird die aus dem p-ständigen Methyl entstandene Carboxylgruppe abgespalten.

Nach Darreichung von **Dimethylanthranilsäure** bildet sich eine gepaarte Glykuronsäure, welche in den Bleiniederschlag übergeht. Die nach dem Entbleien mit $SH_2$ erhaltene Lösung wurde durch Kochen am Rückflußkühler gespalten und die Dimethylanthranilsäure als Jodhydrat über das Perjodid erhalten.

Der nach Darreichung von **Dimethylorthotoluidin** im Harn erzeugte Bleiniederschlag wurde mit Schwefelsäure zerlegt und anhaltend gekocht; nach dem Alkalischmachen wurde mit Äther ausgeschüttelt; im Ätherrückstand war Dimethylparaamidophenol nachweisbar (teilweise Überführung der $CH_3$-Gruppe in COOH).

Nach Darreichung von **Dimethylanilin** war sowohl Para- wie Orthodimethylamidophenol nachweisbar, ebenso nach Darreichung von Dimethylanilinoxyd.

Nach Darreichung von p-Mono-brom-dimethylanilin geht bei der Destillation des alkalisch gemachten Harns reichlich Parabromdimethylorthoamidophenol über.

Versetzt man den nach Darreichung von Dimethylanilin gelassenen Harn mit JH, so erhält man einen Niederschlag, der zum Teil aus Paratrimethylphenolammonium *(P. Griess)* besteht, eine Verbindung, welche die Eigenschaft hat, erst nach dem Kochen mit Mineralsäure die Paraamidophenolreaktion zu geben und selbst nicht zum Auftreten gepaarter Glykuronsäure führt.

[1]) *H. Hildebrandt*, Über das biologische Verhalten von Phenylalkylaminen und Phenylalkylammoniumbasen. Beitr. z. chem. Physiol. Bd. 9. S. 470 (1907).

Der Harn von Kaninchen, welche **Trimethylamidobenzoesäure** (p-Benzbetain[1]) erhalten hatten, wurde mit JH versetzt und der Niederschlag auf Para-dimethylamidobenzoesäure geprüft; das jodwasserstoffsaure Filtrat wurde mit Jod versetzt, zur Darstellung des Perjodids nach *Willstätter* und *Kahn*; der Niederschlag wurde mit Wasserdampf destilliert, dadurch vom Jod befreit und lieferte beim Eindampfen Benzbetainjodhydrat. Der aus dem Harn mittelst Bleiessig erhaltene Niederschlag wurde mit $SH_2$ entbleit, heiß filtriert, das Filtrat am Rückflußkühler gekocht: geringe Mengen Dimethylamidobenzoesäure.

Bei Derivaten des **Phenetidins**[2]), welche unverändert im Harn erscheinen, kann man deren Nachweis in der Weise führen, daß man den Harn zuerst anhaltend mit Salzsäure kocht und dann die in Betracht kommenden Reaktionen anstellt.

Der vom Hunde nach Darreichung von **p-Methylchinolin**[3]) gelassene Harn wurde eingedampft, der Rückstand der alkoholischen Auszüge in Wasser gelöst und mit verdünnter Schwefelsäure versetzt, mit Äther extrahiert. Beim Abdestillieren auf 50 $cm^3$ scheiden sich Kristalle aus, die in Wasser schwer löslich sind, sublimieren, leicht in Ammoniak sich lösen und daraus nicht durch Salzsäure, wohl aber durch verdünnte Essigsäure gefällt werden. p-Chinolinkarbonsäure, Sp. 293°.

Nach Darreichung von **Chinaldin** und **o-Methylchinolin** konnte eine analoge Oxydation nicht nachgewiesen werden; um den Nachweis zu führen, ob überhaupt ein Chinolinderivat in den Harn übergegangen sei, wurde die Destillation mit Zinkstaub angewandt, eine Methode, welche die Entscheidung zu bringen geeignet ist, ob eine ringförmige Substanz einer Zerstörung im Tierkörper anheimfällt. Von Chinolin konnten so höchstens Spuren nachgewiesen werden.

Später bedienten sich *Bergell* und *Pschorr*[4]) dieser Methode, um nachzuweisen, daß aus phenanthrolglykuronsaurem Blei Phenanthren regeneriert werden kann.

Zum Nachweis des nach **Chinolin**[5])-Darreichung im Harn erscheinenden Chinolinchinons wird der Harn auf dem Wasserbade mit konzentrierter Salzsäure (200 Harn, 50 $cm^3$ konzentrierter Salzsäure) auf etwa die Hälfte eingedampft. Unter sorgfältiger Vermeidung alkalischer Reaktion versetzt man mit Natronlauge, bis die Reaktion der Flüssigkeit gegen Lackmuspapier nur noch sehr schwach sauer oder neutral ist, filtriert.

[1]) *H. Hildebrandt*, Zur Frage der glykosidischen Struktur gepaarter Glykuronsäuren. Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. Bd. **7**. S. 438 (1905).

[2]) *H. Hildebrandt*, Über Apolysin und Citrophen nebst Bemerkungen über die praktische Verwendbarkeit von Phenetidinderivaten. Zentralbl. f. inn. Med. Nr. 45 (1895).

[3]) *R. Cohn*, Über das Verhalten einiger Chinolinderivate im tierischen Stoffwechsel. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **20**. S. 210 (1895).

[4]) l. c.

[5]) *H. Fühner*, Über das Verhalten des Chinolins im Tierkörper. Arch. f. exp. Pharm. Bd. **55**. S. 27 (1906).

wäscht das Filtrat mit etwas Alkohol nach und schüttelt die erkaltete Flüssigkeit mit Äther aus. Den Äther wäscht man einige Male mit geringen Mengen destillierten Wassers und schüttelt ihn dann mit stark verdünnter Salzsäure. Die Salzsäure nimmt hierbei intensive Gelbfärbung an, während der überstehende Äther karminrot gefärbt erscheint. Verdünnt man einige Tropfen der gelbgefärbten Salzsäure mit Wasser und versetzt nunmehr mit Ammoniak, so tritt Grünfärbung auf, welche unter der Einwirkung des Luftsauerstoffes rasch in reines Blau übergeht; bei längerem Stehen verdünnter Lösungen, rascher in konzentrierten, bilden sich dunkelblaue, amorphe Flocken und setzen sich zu Boden. Diese lösen sich, abfiltriert, in Alkohol in blauer, in Mineralsäuren mit braunroter oder karminroter Farbe. Die gleichen Farbenreaktionen gibt das 5·6-Chinolinchinon von *Mathëus*, welches durch Kochen des Harns aus dem 5·6-Dioxychinolin unter gleichzeitiger Abspaltung von Glykuronsäure bzw. Schwefelsäure entsteht.

Der Harn von mit **Acridin**[1]) gefütterten Kaninchen wurde unter Zusatz von konzentrierter Salzsäure auf $^1/_3$ seines Volumens eingedampft und mit alkoholischem Äther ausgeschüttelt. Der Äther nimmt das Oxyacridon mit gelber Farbe auf und zeigt prachtvoll hellblaue Fluoreszenz. Nachdem der Äther gewaschen ist, wird er abdestilliert und der im Kolben befindliche Kristallbrei mit wenig heißem Alkohol in ein Becherglas gespült. Die ausgeschiedenen Kristalle werden auf ein Filter gebracht und mit Alkohol kalt gewaschen. Das aus heißem Alkohol wiederholt umkristallisierte Produkt wird im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Sp. 327—330°; es lieferte ein Benzoyloxyacridon.

Der nach Darreichung von **Citral**[2]) von Kaninchen gewonnene Harn wurde zunächst mit Barytwasser ausgefällt und das Filtrat mit basischem Bleiacetat versetzt; der mit heißem Wasser häufig ausgewaschene Niederschlag wurde in der Hitze mit $SH_2$ entbleit; das heiße Filtrat vom Schwefelblei ließ beim Abkühlen eine Säure sich in schneeweißen Kristallen ausscheiden, während weitere Mengen beim Einengen ausfielen; sie wurde als zweibasische Säure erkannt.

Wenn man die restierende Flüssigkeit mit 70%iger Schwefelsäure versetzt, so scheidet sich ein Öl ab, welches der Einwirkung von 65%iger Schwefelsäure unter häufigem Schütteln bei Zimmertemperatur ausgesetzt wird, dann wird mit Wasser verdünnt und mit Äther wiederholt ausgeschüttelt. Nach dem Absieden des Äthers hinterblieb ein öliger Rückstand, welcher mit heißem niedrig siedendem Ligroin aufgenommen wurde, wobei auch nach wiederholtem Auskochen ein Teil ungelöst zurückblieb. Nach dem Erkalten der Ligroinlösung schieden sich an den Wandungen reichliche weiße Kristallmassen ab; die Mutter-

[1]) *H. Fühner,* Über das Verhalten des Acridins im Organismus des Kaninchens. Arch. f. exp. Pharm. Bd. 51. S. 391 (1904).

[2]) *H. Hildebrandt,* Über Synthesen im Tierkörper. Arch. f. exp. Pharm. Bd. 46. S. 261 (1901).

lauge wurde weiter verdunstet und durch Auskochen des Rückstandes mit Wasser noch weitere Mengen der kristallinischen Substanz gewonnen. Schließlich wurde die gewonnene trockene Kristallmasse aus Äther umkristallisiert. Nach dem langsamen Verdunsten des Äthers hatten sich schneeweiße drusenbildende Kristalle am Boden des Gefäßes abgeschieden; die Substanz zeigte saure Reaktion und den Sp. 96°. Sie ist die zyklische Isomere der oben beschriebenen zweibasischen Säure und hat sich aus der amorphen Säure unter der Einwirkung der Schwefelsäure gebildet, analog dem bekannten Übergang der Geraniumsäure in ihre zyklische Isomere. Demgegenüber ließ sich die kristallisierte zweibasische Säure nicht in eine zyklische Isomere überführen, da bei ihr dasjenige Methyl zu Carboxyl oxydiert ist, an welchem bei der Hydrolyse die Anlagerung von Hydroxyl zu erfolgen pflegt; es ist daher anzunehmen, daß in der isomeren amorphen Säure eine der endständigen Methylgruppen zu Carboxyl oxydiert ist.

Zur Gewinnung des nach Darreichung von **Pyramidon** [1]) beim Menschen im Harn auftretenden roten Farbstoffes säuert man den Harn an und schüttelt mit Essigäther; nach dem Verdunsten des Lösungsmittels und Zusatz eines Tropfen Wassers zu dem Rückstand wird der Farbstoff in netzförmig verzweigten, feinen Nadeln wiedergewonnen. Bei Hunden ist nach Pyramidondarreichung der charakteristische rote Farbstoff nur ausnahmsweise und dann nur in sehr geringen Mengen präformiert im Harn vorhanden. Er bildet sich vielmehr erst allmählich beim Stehen an der Luft, nachdem der Harn mit Salzsäure angesäuert war. Die im Harn des Hundes vorhandene Vorstufe wird durch den atmosphärischen Sauerstoff zu dem Farbstoff oxydiert, welcher durch die intensive Purpurfarbe der ammoniakalischen Lösung noch in den geringsten Spuren nachgewiesen werden kann.

Zur Isolierung dient folgende Methode: Der frisch entleerte Urin wird jedesmal mit Salzsäure angesäuert und in weiten, offenen Gefäßen sich selbst überlassen. Der Farbstoff scheidet sich dabei allmählich in roten Flocken aus, die nach ca. 24 Stunden sich nicht weiter vermehren. Aus größeren Mengen Harns gesammelt, filtriert, gewaschen und an der Luft getrocknet, erhält man den Farbstoff als rote Masse, vermengt mit anderen Stoffen, welche sich aus dem angesäuerten Hundeharn ausscheiden, vor allem Kynurensäure und Schwefel. Um es von diesen Verunreinigungen zu befreien, wird das Rohprodukt mit verdünntem Ammoniak übergossen und wiederholt mit Essigäther geschüttelt, so lange dieser sich noch rot färbt. Beim Abdestillieren des Ammoniaks wird der Farbstoff in prachtvollen roten Nadeln erhalten und aus Essigäther oder Eisessig umkristallisiert. Die Ausbeute an dem reinen Produkt beträgt nicht mehr als 1—1½% des verfütterten Pyramidons. Sp. 184°. Durch reduzierende Mittel, wie Schwefelammonium, Eisessig und Zinkstaub, wird die Substanz sehr leicht

[1]) *M. Jaffé*, Über den durch Pyramidongebrauch im Harn auftretenden roten Farbstoff. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Bd. **34**. S. 2737 (1901).

entfärbt; doch geht die entstandene Leukoverbindung an der Luft sehr bald wieder in den Farbstoff über. Dieser ist identisch mit der Rubazonsäure von *Knorr*, welche entsteht bei der Oxydation des Phenylmethylamidopyrazolons. Demnach wird Pyramidon im Organismus zum Teil derart verändert, daß ihm die drei an den beiden N-Atomen befindlichen Methylgruppen entzogen werden, während die mit Kohlenstoff verbundene intakt bleibt und überdies bei der Verschmelzung der Pyramidonmoleküle eine Abspaltung von Ammoniak stattfindet.

Die von der Rubazonsäure getrennten[1]) salzsauren Filtrate werden mit Natriumkarbonat schwach alkalisch gemacht, bei gelinder Wärme auf dem Wasserbade bis zum dünnen Sirup eingedampft, von dem auskristallisierten Kochsalz abgegossen, noch warm mit dem vierfachen Volumen einer Mischung gleicher Teile Alkohol und Äther vermengt und unter öfterem Umrühren mehrere Tage stehen gelassen. Nach dem Abgießen der Lösung wird der Rückstand von neuem mit der Alkoholäthermischung zweimal behandelt; der rückständige Sirup enthält eine gepaarte Glykuronsäure. Die Lösung enthält eine mit Eisenchlorid sich violett färbende Substanz. Der nach dem Abdestillieren des Alkohols bleibende Rückstand wird in viel Wasser gelöst, mit Schwefelsäure bis 5% angesäuert und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Dann wird durch schwaches Erwärmen mit Barythydrat zerlegt und aus dem Filtrat mit $CO_2$ das Baryt entfernt. Das Filtrat wird im Vakuum eingeengt, wobei eine Ausscheidung von Kristallen erfolgt. Aus der wässerigen Lösung fällt man mittelst Aceton das Kreatin und engt das Filtrat auf dem Wasserbade ein, wobei sich die mit Eisenchlorid färbende Verbindung ausscheidet, die aus Wasser umkristallisiert wird: Antipyrylharnstoff (Uramidoantipyrin), Sp. 247—248°. Beim Erhitzen mit heißgesättigtem Barytwasser bei 140—150° zerfällt die Verbindung in $CO_2$, $NH_3$ und Amidoantipyrin. Antipyrylharnstoff entsteht also aus Pyramidon durch Eliminierung der beiden am Amidostickstoff befindlichen Methylgruppen.

---

[1]) *M. Jaffé*, Antipyrylharnstoff, ein Stoffwechselprodukt des Pyramidons. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Bd. **35**. S. 2891 (1902).

# Gesamtstoffwechsel.

## A. Methoden des Stoffwechselversuches im allgemeinen.

### a) Stoffwechselversuche beim Menschen.

### α) Stoffwechseluntersuchungen an erwachsenen Individuen.

(Eiweiß-Kohlehydrat-Fettstoffwechsel; Nukleinstoffwechsel, Salzstoffwechsel, Wasserstoffwechsel.)

Von **Theodor Brugsch**, Berlin.

## I. Vorbemerkungen.

Stoffwechselversuche lassen sich beim Menschen nicht nur nach der energetischen Seite hin durchführen, man ist vielmehr auch imstande, ohne Bestimmung des Gesamtumsatzes Stoffwechselversuche über den Umsatz des Eiweißes, unter gewissen Umständen auch der Kohlehydrate und Fette, ferner auch über den Nukleinumsatz, den Umsatz der Salze und des Wassers anzustellen.

Bei der Durchführung eines Eiweiß-Kohlehydrat-Fettstoffwechsels muß man indessen in erster Linie von dem Gesamtenergieumsatz ausgehen, dessen Größe für das betreffende Individuum nach seinem Kilogewicht und nach den Bedingungen, unter denen der Versuch angestellt werden soll, zu berechnen ist. Auf Grund dieser Berechnung ist dann die Nahrung zu wählen, wobei hinsichtlich der Vertretung der Kohlehydrate und Fette in der Nahrung nach dem *Rubner*schen Gesetz der Isodynamie verfahren werden kann, während man bei der Bemessung des täglich zuzuführenden Eiweißes eine bestimmte untere Grenze der Eiweißzufuhr einhalten muß (siehe weiter unten). Erst auf dieser Grundlage ist die Durchführung des speziellen Eiweiß- etc. Stoffwechselversuches möglich.

Die weitere Aufgabe eines derartigen Stoffwechselversuches ist nun die Analyse der zu verabreichenden Nahrung (eventuell nur nach einer bestimmten Richtung hin, z. B. auf Eiweiß), das Auffangen der Ausscheidungen, von denen im allgemeinen nur Kot, Harn, eventuell auch der Schweiß zu berücksichtigen sind.

Das Ziel des einzelnen Stoffwechselversuches kann dabei ein ganz verschiedenes sein und danach richtet sich auch die Dauer der Versuche, die Einteilung der Versuchstage in verschiedene Perioden, die Veränderung der Nahrung während des Versuches, die Verabreichung bestimmter Medikamente, deren Einfluß auf den Stoffwechselversuch geprüft werden soll etc. Diese Bedingungen werden weiter unten im einzelnen ihre Besprechung finden.

Die besonderen Bedingungen, unter denen schließlich der Nukleinstoffwechselversuch, der Salz- und Wasserstoffwechsel anzustellen ist, werden im speziellen besprochen.

### a) Das Kalorienbedürfnis.

Das Kalorienbedürfnis des zur Untersuchung gelangenden Individuums ist davon abhängig, ob sich dieses im Zustande der Ruhe, der leichten körperlichen Bewegung oder der angestrengten Arbeit befindet. Für ein erwachsenes Individuum von mittlerer Körpertemperatur mittlerer Körpergröße kann man pro Tag und Kilogramm Körpergewicht folgende Werte zugrunde legen:

| | | |
|---|---|---|
| Bei absoluter Bettruhe . . . . . | 24—30 | Kalorien, |
| bei gewöhnlicher Bettruhe . . . . | 30—34 | „ |
| außer Bett, ohne körperliche Arbeit | 34—40 | „ |
| bei mittlerer Arbeitsleistung . . . | 40—45 | „ |
| bei starker Arbeitsleistung . . . | 45—60 | „ |

Bei kleinen Individuen, ferner bei mageren ist das Kalorienbedürfnis noch höher anzusetzen, während es bei Fettleibigen niedriger zu veranschlagen ist. Im allgemeinen kann man in klinischen Stoffwechselversuchen bei Patienten, die bettlägerig sind, das Kalorienbedürfnis von 30 Kalorien pro Kilo Gewicht für die Berechnung der Nahrung im Stoffwechselversuch zugrunde legen.

### b) Berechnung der Kost auf Grund des minimalen Eiweißbedarfes und nach dem Gesetze der Isodynamie der Nahrungsstoffe.

Hat man für das zu untersuchende Individuum die Größe des Kalorienbedarfes festgestellt, so ist die nächste Aufgabe die, die Nahrung nach diesem Gesichtspunkte zusammenzustellen; dabei ist zu beachten, daß unter den drei Nahrungsstoffen Eiweiß, Fett und Kohlehydraten das erstere in derjenigen Menge vorhanden ist, daß der Körper seinen Eiweißbestand zu erhalten in der Lage ist.

Das kann natürlich nur für normale Verhältnisse gelten, über Besonderheiten in dieser Beziehung siehe weiter unten.

Diese Eiweißmenge, die weder durch Fett noch durch Kohlehydrate gedeckt werden kann, die also zur stofflichen Erhaltung des Körpers absolut notwendig ist, nennt man das Eiweißminimum oder das Erhaltungseiweiß. Sie beträgt nach *Voit* für mittlere Erwachsene ca. 85 *g* (trockenes

Eiweiß) und variiert je nach der Größe des Individuums, wächst aber nicht durch Arbeitsleistung. Als Schwellenwert für die unterste Grenze dieses Eiweißbedürfnisses hat man 0·6 *g* Eiweiß pro Kilogramm Körpergewicht und pro Tag angegeben. Es empfiehlt sich indessen mehr, als Basis des Stoffwechselversuches bei Erwachsenen eine Eiweißzufuhr von etwa 80 *g* Eiweiß zu wählen. Den Rest der geforderten Kalorienmenge deckt man durch Kohlehydrate (und zwar am besten zu 50% des Gesamtkalorienbedürfnisses) und den Rest durch Fette, eventuell zu einem kleinen Teil auch noch durch Eiweiß.

Dieselbe Energie bzw. Wärmemenge, welche die drei wichtigsten organischen Nahrungsstoffe: Eiweiß, Fett und Kohlehydrate außerhalb des Körpers entfalten und die wir durch die Kalorie als Einheitswert ausdrücken, entfalten sie auch bei ihrem Umsatz im Organismus. Das Eiweiß macht hierbei allerdings eine Ausnahme, indem es nicht wie die Kohlehydrate und Fette im Organismus vollständig aufgespalten wird, sondern es gehen mit dem Harn und Kot noch höhere N-haltige Produkte ab, die noch einen gewissen Brennwert besitzen. *Rubner* hat gefunden, daß (nach Abzug dieses Brennwertes vom Gesamtbrennwerte des Eiweißes) der Brennwert des Eiweißes im Organismus, id est der physiologische Nutzeffekt des Eiweißes für den Organismus 22 bis 28% geringer ist als der Gesamtbrennwert des Eiweißes.

Für die Berechnung der zur Deckung des Kalorienbedürfnisses notwendigen Nahrung legt man nun folgende empirisch gefundene Werte *(Rubner)* zugrunde:

| | | |
|---|---|---|
| Für 1 *g* Eiweiß . . . . . | 4·1 Kal. | (Kalorienwert 5·5—6 Kal.) |
| „ 1 *g* Fett . . . . . . | 9·3 „ | ( „ 9·3 Kal.) |
| „ 1 *g* Kohlehydrat . . | 4·1 „ | ( „ 4·1 „ ) |
| [„ 1 *g* Alkohol . . . | 7·0 „ | ]. |

Auf Grund dieser Werte läßt sich nun sehr leicht die zur Deckung des Kalorienbedürfnisses erforderliche Nahrung berechnen, indem man nach Abzug des sog. Erhaltungseiweißes den Rest durch Kohlehydrate oder Fett, zum Teil auch noch durch Eiweiß nach dem Gesetze der Isodynamie deckt.

Beispiel: Ein 83 *kg* schweres Individuum soll eine seinem Kalorienbedürfnis angepaßte Kost erhalten. Notwendige Kalorienmenge (berechnet für Bettruhe) = 30 × 83 = 2490, also 2500 Kal.: davon sind zu decken durch Eiweiß 80 × 4·1 Kalorien = 328. Der Rest = 2172 durch Fett oder Kohlehydrate, und zwar am zweckmäßigsten 1250 Kal. durch Kohlehydrate, das übrige (also ca. 920 Kal.) durch Fett.

### c) Auswahl der Nahrung.

Von maßgebender Bedeutung für den Stoffwechselversuch ist nun die Auswahl der Nahrung nach den obigen Gesichtspunkten. Die Nahrung besteht bekanntlich aus einem Gemenge von Nahrungsmitteln, die wiederum eine Mischung der Nahrungsstoffe darstellen. Die Nahrungsstoffe als solche zu genießen, ist für Eiweiß, Fette und Kohlehydrate bei längeren Stoffwechselversuchen nicht durchführbar: man muß sich also dazu entschließen, die Nahrung so zu wählen, daß ihr Gehalt an Nahrungsstoffen ungefähr ein derartiger ist, wie er für den speziellen Stoffwechselversuch nach der

Kalorienberechnung erforderlich ist. Das gelingt heute leicht schätzungsweise auf Grund der vielen bisherigen Nahrungsmittelanalysen, wie sie z. B. in *Königs* Tabellen [1]) niedergelegt sind. Dabei ist darauf Rücksicht zu nehmen, daß die Kost leicht analysierbar ist und daß sie auch gern und längere Zeit genommen wird. Ferner muß die Kost für länger dauernde Stoffwechselversuche wenigstens in den einzelnen Perioden die gleiche sein. Es sei hier das Beispiel einer kalorisch berechneten Kostordnung gegeben, die sich praktisch als sehr brauchbar für Stoffwechselversuche erweist; die Kost soll etwa 110 *g* Eiweiß enthalten und ihr energetischer Wert 2500 Kalorien betragen.

| | Menge | Gesamt N | Fett | Kohlehydrate | Wasser |
|---|---|---|---|---|---|
| Milch . . . . . . . . | 1500 | 7·5 | 45 | 67·5 | 1335 |
| Fleisch . . . . . . . . | 150 | 5·1 | 1·32 | — | 114 |
| Weißbrot . . . . . . . | 350 | 4·48 | 3·5 | 210·0 | 90 |
| Butter . . . . . . . . | 50 | 0·1 | 45·0 | — | 5 |
| 1 Ei ohne Schale . . | 40 | 0·9 | 4·4 | | 30 |
| Selters . . . . . . . . | 500 | — | — | — | 500 |
| | | 18·08 | 99·22 | 277·5 | 2074 |

Die Kost enthält also:

18·08 × 6·25 = 113 *g* Eiweiß (× 4·1) = 463·3 Kal.
99·22 *g* Fett (× 9·3) = 922·75 „
277·5 *g* Kohlehydrat (× 4·1) = 1137·75 „
in Summa 2523·8 Kal.

Diese Kost kann man nun durch Fortnahme von Fett (z. B. der Butter) oder Kohlehydraten (Weißbrot) oder durch Wegnahme von Fleisch beliebig einengen. Man muß dabei natürlich den individuellen Verhältnissen Rechnung tragen; Personen, die keine Milch trinken, kann man statt dessen eine größere Butterzulage und Fleischzulage verabreichen; umgekehrt für Personen, die keine größeren Buttermengen zu bewältigen vermögen, empfiehlt sich die Zulage von Sahne, die außerordentlich fettreich ist. Von wesentlicher Bedeutung ist schließlich noch die Wasserzufuhr, die täglich die gleiche bleiben soll. Man führe Erwachsenen einschließlich des in den Speisen enthaltenen Wassers täglich nicht mehr wie ca. 2—2½ *l* zu.

### d) Analyse der Nahrungsmittel.

Für exakte Stoffwechselversuche ist eine exakte Analyse der Nahrungsmittel unerläßlich. Dadurch wird natürlich die Ausführung eines derartigen Stoffwechselversuches sehr erschwert, da, wenn z. B. sechs verschiedene Nahrungsmittel verabreicht werden, diese samt und sonders und noch dazu täglich analysiert werden müßten. Indessen läßt sich diese Schwierigkeit doch leicht umgehen, wenn man folgendermaßen verfährt: Als Milch verwendet man irgend eine Milchkonserve (in Büchsen), von der man sich einen größeren Vorrat anschafft; auf diese Weise wird nur eine ein-

[1]) *König,* Chemie der Nahrungs- und Genußmittel (1910).

malige Analyse (für jede Büchse) notwendig: verabreicht man frische Milch, so ist wegen des wechselnden N-Gehaltes und Fettgehaltes eine tägliche Analyse notwendig. Als Fleisch wählt man mageres Ochsenfleisch, das man im Stück auf 3—4 Tage reichend, kauft. Das Fleisch muß auf Eis aufbewahrt werden. Auch dadurch wird nur eine einmalige Analysierung für je 3—4 Tage notwendig. Ebenso verfährt man mit der Butter; handelt es sich um völlig genaue Analysen, so läßt man aus der Nahrung die Eier aus; das Brot kauft man im Stück, indem man es nur vorsichtig vor Verdunstung schützt (einmalige Analysierung). Sehr bequem ist die Verabreichung von Reis, der sehr viel Kohlehydrate enthält; man wähle nur die teuersten Reissorten, da ihr Stickstoff weit besser im Darm ausgenutzt wird, als der der minderwertigen. Den Reis läßt man zweckmäßig als Milchreis zubereiten. Auch von einer Reissorte genügt für einen Stoffwechselversuch einmalige Analyse. Wenig geeignet für Stoffwechselversuche sind die Kartoffeln hauptsächlich wegen ihres stark schwankenden Eiweiß- und Kohlehydratgehaltes. In den Nahrungsmitteln kann man nun nicht den Gehalt an reinem Eiweiß, reinem Fett und reinem Kohlehydrat bestimmen, sondern man bestimmt zunächst den Trockenrückstand und in diesem den Stickstoffgehalt; durch Multiplikation mit der Zahl 6·25 wird der Eiweißgehalt berechnet.

Weiter bestimmt man in dem Trockenrückstand das Ätherextrakt, das als Fett berechnet wird, und schließlich bestimmt man die Asche. Die Kohlehydrate werden meist als Rest berechnet (Trockenrückstand weniger Eiweiß, weniger Fett und weniger Asche), indessen ist es doch weit ratsamer, die Kohlehydrate durch Aufschließen mit 2%iger Salzsäure durch 2 Stunden am Rückflußkühler (man nimmt etwa 2—3 *g* Substanz) in lösliche Kohlehydrate überzuführen und durch Polarisation oder Reduktion *(Allihn)* zu bestimmen. Kennt man den Wert des analysierten Nahrungsmittels an Eiweiß, Fett, Kohlehydraten, so läßt sich daraus der Kaloriengehalt berechnen, indessen empfiehlt es sich auch hier mehr, den Trockenrückstand der direkten Kalorimetrie mit der *Berthelot*schen Bombe zu unterwerfen.

### e) Sammeln der Ausscheidungen.

Von den Ausscheidungen des Körpers, die für Stoffwechselversuche von Bedeutung sind, kommen in erster Linie nur Kot und Harn in Frage. In manchen Versuchen, wobei stark geschwitzt wird, z. B. im Dampfbad, kommt auch der Schweiß in Frage, doch wird man in der Mehrzahl der Fälle den Schweiß völlig unberücksichtigt lassen können. Nicht unbedeutend sind dagegen Substanzverluste des Körpers, die durch Abgang von Menstrualblut, Milch, eventuell Sperma entstehen können; aus diesem Grunde wird man es daher möglichst vorziehen, solcher Art behaftete Personen von exakten Stoffwechselversuchen auszuschließen, sofern nicht etwa nach dieser Richtung hin ein spezielles Ziel mit dem Stoffwechselversuch verfolgt wird. In diesem Falle müssen dann Menstrualblut, Milch, Sperma kunstgerecht aufgefangen und wie die übrigen Ausscheidungen analysiert werden. Sonstige Substanz-

verluste des Körpers, wie durch abgeschilferte Epidermis, abgestoßene Nägel, ausgefallene Haare, sind völlig zu vernachlässigen. Erbricht das Individuum während eines Versuches, so sind diese Verluste von der Einnahme in Abzug zu bringen.

### Abgrenzung und Sammlung des Kotes.

Um den zu einer Versuchsreihe zugehörigen Kot scharf abzugrenzen, kann man so verfahren, daß das Versuchsindividuum am Mittag vor dem Versuche zum letzten Male feste Nahrung zu sich nimmt und in den späteren Stunden nur noch dünne Suppen (keine Milch). Zu Beginn des Versuches erhält die Person 3 Eßlöffel von folgender Mischung:

Carbo vegetabilis 15·0,
Mucilag. Gummi arab. 15·0.
Aq. menth. piper. 60.

Danach ist der Mund gehörig zu spülen. Durch die Kohle werden die ersten zum Versuche gehörigen Kotmassen schwarz gefärbt. Zweckmäßig läßt man dann noch das Individuum am Nachmittag des ersten Tages, bei lebhafterer Peristaltik eventuell am Vormittag einen Stuhl absetzen (eventuell unter der Wirkung eines Glyzerinklistiers); dieser Stuhl kann, sofern er, was gewöhnlich der Fall ist, keine Spur Kohle enthält, beiseite gelassen werden; erst der nächste Stuhl pflegt durch die Kohle gezeichnet zu sein. Kotpartien, die diesem zweiten Stuhle anhaften und noch nicht durch Kohle gefärbt sind, sind dabei zu entfernen. Bei dieser mehrtägigen Versuchsreihe („als Periode" usw.) wird der Stuhl wieder durch Kohle abgegrenzt, und zwar gibt man die Kohle am Morgen des dem letzten Versuchstage der Periode folgenden Tages; der nunmehr schwarz gefärbte Kot gehört nicht mehr zu dieser ersten Versuchsreihe. Der gesamte, zu einem Versuch gehörige Kot wird schließlich in einer Porzellanschale gesammelt und die Verarbeitung, wie weiter unten dargelegt, vorgenommen.

Statt den Kot durch Kohle abzugrenzen, ist es zweckmäßiger, dies durch Karmin zu bewirken. Man verabreicht zu Beginn des Versuches in der gleichen Weise, wie oben dargelegt, statt Kohle 0·3—0·5 *g* Karmin in Oblaten mit der ersten Nahrungsportion. Dadurch wird der erste Stuhl diffus rot gefärbt. Unterstützend wirkt dabei für die Abgrenzung des roten Kotes, wenn man die Versuchsperson gleichzeitig mit dem Karmin Milch nehmen läßt (Voraussetzung ist natürlich dabei, daß die Milch unter die Einnahmen in Rechnung gestellt ist).

### Sammeln des Harns.

Der Harn wird täglich gesammelt und zwar von morgens 8 Uhr bis zum nächsten Morgen 8 Uhr = 1 Versuchstag; dabei wird der Harn in eine verschließbare 2—3 *l* (eventuell mehr) fassende Flasche unmittelbar entleert oder sofort nach der Entleerung in ein Nachtgeschirr durch einen

Trichter in die Flasche gegossen. Den Boden der Flasche sollen etwa 20 $cm^3$ Chloroform bedecken, um eine Zersetzung des Harns zu verhüten. Jeden Morgen 8 Uhr wird die Flasche erneuert, dabei ist die Versuchsperson anzuhalten, daß sie möglichst vor dem Wechsel der Flasche noch einmal uriniert. Erst nach dem Wechsel der Flasche darf dann die Versuchsperson ihr Frühstück verzehren.

Besonders ist noch die Versuchsperson anzuhalten, daß sie vor jeder Stuhlentleerung Urin in die Flasche läßt, weil sonst Kot und Urin sich vermischen. Besonders bei Frauen, bei denen überhaupt die Durchführung eines Stoffwechselversuches auf größere Schwierigkeiten stößt, ist hierauf zu achten.

Trotzdem gelingt es oftmals nicht, die Versuchstage hinsichtlich der Urinentleerung scharf abzugrenzen, indem häufig Urin von einem Tag noch auf die Urinmenge des anderen Tages herübergebracht wird (z. B. bei Frauen mit schlaffen Bauchdecken, die ihre Blase nicht völlig entleeren können). Dieser Fehler macht indessen den Versuch noch keineswegs zu schanden, da er sich meist auszugleichen pflegt, wenn die Versuchsperson konstant eingestellt ist, und weil man meist die Periode als ganzes nimmt. Mit dem Katheterisieren, das im Tierversuch im weitesten Maße üblich ist, muß man beim Menschen vorsichtig sein.

### Sammeln von Schweiß.

Soll der Schweiß berücksichtigt werden, so hüllt man die Versuchsperson in eine zuvor gut ausgewaschene Flanelldecke ein. Nach Beendigung des Versuches wird die Flanelldecke mehrmals ausgekocht, das Ausgekochte eingedampft und analysiert.

## f) Analyse der Ausscheidungen.

**Kot.** Zur Bestimmung der Trockensubstanz des Kotes wird der frisch entleerte Kot gewogen und sein Gewicht notiert (Gewicht des Gefäßes + Kot weniger dem leeren Gefäßgewicht), alsdann erst wird er in die ebenfalls mit einem Glasstabe zusammen gewogene Porzellanschale gebracht, mit wenig $\frac{1}{2}$ ‰igem $H_2SO_4$-Wasser übergossen (damit kein $NH_3$ entweicht) und auf dem Wasserbade mit dem Glasstabe gleichmäßig gerührt. Die nächste zur entsprechenden Versuchsreihe gehörige Kotportion wird ebenfalls frisch gewogen, das Gewicht notiert und zu dem bereits auf dem Wasserbade trocknenden Kote unter erneuertem Zusatz von schwach schwefelsäurehaltigem Wasser hinzugefügt. Der Kot wird ebenfalls mit der ersten Portion zusammen tüchtig durchgerührt. Auf diese Weise werden alle zu einer Versuchsreihe gehörigen Kotportionen getrocknet; um den Kot völlig lufttrocken zu machen, bringt man ihn auf 5—6 Stunden in einen Trockenschrank von 105° C. Danach wird der Kot mit der Schale und dem Glasstabe zusammen gewogen; da man das Gewicht der Porzellanschale mit dem Glasstabe kennt, so stellt die Differenz das Gewicht des Trockenkotes vor. Da man auch das Ge-

wicht des frisch entleerten feuchten Kotes kennt, so läßt sich prozentisch der Trockengehalt des Kotes berechnen. Jetzt wird der trockene, schon vorher durch Umrühren gut gemischte Kot nach Möglichkeit aus der Porzellanschale und von dem Glasstabe abgekratzt und durch Verreiben in einem Mörser pulverisiert; statt dessen kann man den Trockenkot auch in einer Kaffeemühle fein zerreiben. Der pulverisierte Kot wird in einem gut schließenden Gefäße aufbewahrt. Von diesem Trockenkot läßt sich nun leicht eine N-Analyse nach *Kjeldahl*, eine C-Analyse durch Verbrennung nach *Liebig* herstellen. Zur Fettbestimmung wird ein gewogener aliquoter Teil des Kotes (2—4 *g* etwa) in einer Soxhlethülse mit Äther extrahiert, die Seifen werden sodann, wenn die Patrone getrocknet ist, durch Kochen des Inhaltes der Soxhlethülse mit 1%igem salzsäurehaltigen Alkohol in Fettsäuren überführt und diese dann nochmals mit Äther (besser Petroläther) im Soxhlet extrahiert. Zur Kohlehydratbestimmung werden die Kohlehydrate des Kotes durch Kochen mit 2%iger HCl-Lösung am Rückflußkühler während mehrerer Stunden in lösliche Kohlehydrate übergeführt und nach *Allihn* oder *Bang* etc. bestimmt. Aschenanalysen werden an der Trockensubstanz des Kotes in üblicher Weise ausgeführt.

Kontrollanalysen sind stets durchzuführen.

**Erbrochenes.**

Die Analyse des Erbrochenen vollzieht sich in genau der gleichen Weise wie die Analyse des Kotes, wobei indessen wegen des sauren Charakters des Erbrochenen — da eine Gefahr der $NH_3$-Entweichung nicht besteht — ein Zusatz von verdünnter Schwefelsäure beim Eindampfen auf dem Wasserbade nicht notwendig ist.

**Harn.**

Die 24stündige Harnmenge wird mit einem Meßzylinder gemessen (der Harn muß gut durchgemischt sein), sodann das spezifische Gewicht festgestellt. Zur N-Analyse genügen je 5 $cm^3$ Urin, die mit einer gradierten Pipette scharf abgemessen werden. Zur C-Bestimmung wird der Harn aus einer Pipette vorsichtig auf ein Schiffchen getropft und im Vakuum unter $H_2SO_4$ bei Stubentemperatur verdampft. Mit dem eingetrockneten Urin wird die C-Analyse ausgeführt. Die Aschenanalysen werden nach den für den Harn üblichen Regeln analysiert.

**Schweiß.**

Der aus dem Bekleidungsstücke ausgekochte und eingedampfte Rückstand des Schweißes wird nach denselben Prinzipien wie der Harn verarbeitet.

### g) Einteilung des Stoffwechselversuches in Perioden.

Je nach dem verfolgten Zweck wird die Dauer eines Stoffwechselversuches beim Menschen eine verschieden lange sein; er kann sich u. a. über Wochen und Monate hinausziehen, schon das allein ergibt die Notwendigkeit, den Stoffwechselversuch in einzelne Perioden zu teilen. Für

jede derartige Periode sollte es Voraussetzung sein, daß die täglich zugeführte Kost genau die gleiche ist, dann läßt sich während einer Reihe von Tagen nicht nur die Einnahme genau mit der Ausgabe durch Harn und Kot bilanzieren, vor allem zeigt sich auch hier z. B. die tägliche Stickstoffausscheidung als zuverlässigeres Maß für die innerhalb 24 Stunden umgesetzte Eiweißmenge. Wechselt innerhalb der einzelnen Tage die Eiweißmenge beträchtlich, so kann man zwar Einnahme und Ausgabe der ganzen Periode bilanzieren, indessen schon nicht mehr die innerhalb 24 Stunden ausgeschiedene N-Menge als Maß für den Eiweißumsatz innerhalb dieser Zeit annehmen; einen wesentlichen Vorteil bietet die Periode sodann bei gleichmäßig bleibender Kost noch, indem man die Abgrenzung des Kotes mit der Periode beginnt und schließt. Man kann dadurch nämlich mit einigem Recht den Gehalt des Kotes an den zur Untersuchung kommenden Stoffen auf die einzelnen Tage verteilen, wozu man sonst nicht berechtigt ist. In klinischen Versuchen pflegt man vielfach den Stoffwechselversuch in drei Perioden aufzulösen: Vorperiode, während deren sich das Versuchsindividuum mit der ihm zu verabreichenden Kost ins Kalorien- und Stickstoffgleichgewicht zu setzen hat, zweitens in die Hauptperiode, die den eigentlichen Zweck des Stoffwechselversuches vorstellt, nämlich die Erprobung irgend eines Mittels, sei es Medikamentes oder Nährstoffes auf den Stoffwechsel, und in die Nachperiode, die wieder der Vorperiode in Bezug auf die Einnahmen gleichen soll. Die Nachperiode soll gewissermaßen die Nachwirkung demonstrieren. Im Prinzip ist jedenfalls an derartigen Vor- und Nachperioden strikte festzuhalten, wenn gleich man sich nicht ängstlich an ein Schema zu halten braucht. Im übrigen wird im speziellen noch auf diese Verhältnisse eingegangen.

Zu Beginn einer jeden Periode (und zwar am besten morgens nüchtern 8 Uhr, wenn der Patient Urin entleert hat) ist exakt das Körpergewicht festzustellen; noch zuverlässiger sind tägliche Körpergewichtsmessungen.

## II. Ausnutzungsversuche (Resorptionsversuche).

Die Einverleibung der Nahrung per os bedeutet noch nicht, daß diese nun auch in den Organismus, diesem zur stofflichen und dynamischen Verfügung stehend, eingetreten ist. Dazu muß sie erst durch die Darmwand resorbiert sein. Vorbedingung für den eigentlichen Stoffwechselversuch ist also die Resorption der Nahrung. Die Größe der Resorption ließe sich ja nun durch ein einfaches Rechenexempel feststellen: man vergleicht die eingenommenen Ingesta mit den durch den Kot zu Verlust gegangenen Stoffen; die Differenz muß resorbiert sein; die Differenz verglichen mit der Nahrungsaufnahme wäre die Resorptionsgröße. Indessen ist eine derartige Überlegung insofern nicht einwandfrei, als durch den Darm der Körper von seiner eigenen Substanz etwas abgibt; der Darm stellt also bis zu einem gewissen Grade auch Exkretionsorgan vor. Die Fäzes sind nicht allein Nahrungsschlacken, sondern sie sind Nahrungsschlacken und

Reste der Darmsekrete, Darmepithelien und Bakterien, die im Darme am Kosten dieser Stoffe schmarotzen. Einen Weg zur Trennung der Nahrungsschlacken von den vom Körper durch den Darm abgegebenen Stoffen besitzen wir nicht, wir können daher auch für den Stoffwechselversuch beides nicht trennen. Aus diesem Grunde allein pflegen wir auch die Nahrungsaufnahme mit der Kotausscheidung zu vergleichen und danach die Resorptionsgröße zu berechnen. Für jeden exakten Stoffwechselversuch ist nun die Feststellung der Resorptionsgröße eine conditio sine qua non. Die Durchführung eines Resorptionsversuches kann nun auch Endzweck eines Stoffwechselversuches sein, und zwar dann, wenn man feststellen will, wie beispielsweise eine bestimmte Kost kalorisch ausgenutzt wird, oder wie der Eiweiß-, Fett-, Kohlehydratgehalt einer bestimmten Kost oder eines Nahrungsmittels, z. B. die Kartoffel, oder der Reis oder Fleisch etc., von einem gesunden Darm ausgenutzt wird. Derartige Versuche, die in der Literatur bereits vielfach durchgeführt sind, erfordern eine sehr exakte Abgrenzung des Kotes. Die Beurteilung solcher Versuche gewinnt an Sicherheit, wenn man sie über mehrere Tage durchführen kann, was indessen oft nicht durchführbar ist, z. B. wenn man der Versuchsperson große Mengen Fett oder Kartoffeln u. dgl. mehr zumutet. Für solche Versuche ist eine Durchführung in mehreren Perioden nicht notwendig. Will man die Ausnutzbarkeit eines Nahrungsmittels unter optimalen Verhältnissen feststellen, so empfiehlt sich, den Nährstoff, z. B. eine besondere Art Brot, in der Form zu geben, in der man es gewöhnlich zu genießen pflegt. Nur muß man darauf achten, daß die sonstige mit dem Prüfungsobjekt zu gebende Nahrung derartig zusammengesetzt ist, daß ihre Resorption (hinsichtlich Eiweiß-Fett-Kohlehydrate) eine gute ist. Will man die Ausnutzbarkeit irgend eines Fettes beispielsweise prüfen, so wird man das Fett in mäßigen Mengen verabreichen (nicht mehr wie 100 *g*) und wird aus der übrigen Nahrung das Fett ganz fortlassen; ist es ein Eiweiß- oder Kohlehydrat, so gilt das gleiche von diesen Nährstoffen.

Beispiele (nach *v. Noorden*):

Es soll eine neue Brotart (N- und Kohlehydratträger) geprüft werden — zweckmäßige Kost: 500 *g* Brot (Prüfungsobjekt), 100 *g* Butter, 20 *g* Salz, 1 *l* Wasser, 1 *l* Bier; oder es soll eine besondere Fettart, z. B. Lipanin, geprüft werden — zweckmäßige Kost: 300 *g* zartes Fleisch, 400 *g* feines Weizenbrot, 100 *g* Lipanin, 20 *g* Salz, 1 *l* Wasser, 1 *l* Bier.

(Nahrung und Kot sind auf N, Kohlehydrate, Fett zu analysieren; der Versuch hat sich auf mehrere (3) Tage zu erstrecken; zweckmäßig zur sicheren Beurteilung Durchführung des Versuches an zwei Gesunden.)

Unter pathologischen Verhältnissen kann es beim Menschen zu Störungen der Resorption kommen. Diese Resorptionsstörungen — meist im Gefolge von Erkrankungen der Leber, der Pankreas-, der Darmwand — können die Ausnutzung des Eiweißes, der Fette und der Kohlehydrate betreffen, und zwar insgesamt für alle oder für den einen oder

den anderen Nährstoff allein. Hier hat die Aufgabe eines Ausnutzungsversuches ein anderes Ziel. Es soll festgestellt werden, wie eine bestimmte Kost, die unter normalen Verhältnissen gut ausgenutzt wird, von dem Darm des Versuchsindividuums ausgenutzt wird.

Zu diesem Zwecke gibt man eine Nahrung, über deren Resorption unter normalen Verhältnissen man hinreichend orientiert ist.

Beispiel *(v. Noorden)*:

Milch 1000 *cm*³, feines Weizenbrot 180 *g*, zartes Ochsenfleisch 200 *g*, Butter 70 *g*, Wasser, Wein, Salz nach Bedarf.

Von dieser Kost gehen normalerweise mit dem Kot ca. 5—6°/₀ der Trockensubstanz, ca. 6°/₀ des N, ca. 5—8°/₀ des Fettes zu Verlust.

Versuchsdauer 3—4 Tage.

Oder man gibt eine Kost, die noch einfacher zu analysieren ist und die etwas größere Fettmengen dem Versuchsindividuum anbietet. (Bei geringen Fettmengen, z. B. unter 50 *g*, sind relativ die Fettverluste durch die Fäzes größer als bei größeren Fettmengen, andrerseits gibt gerade die Fettresorption den besten Indikator für Resorptionsstörungen überhaupt.)

Eine solche Kost besteht aus: 2—3 *l* Milch, 50—100 *g* Butter, 100 bis 200 *g* Weißbrot.

Von dieser Kost gehen normalerweise durch den Kot ca. 5—10°/₀ der Trockensubstanz, ca. 5—10°/₀ N, ca. 5—10°/₀ Fett zu Verlust.

Versuchsdauer 2—4 Tage.

Es sei hier schließlich noch ein Beispiel angeführt, in welcher Weise sich ein derartiger Ausnutzungsversuch, bei der die Nahrung und der Kot exakt analysiert sein muß, praktisch durchführen läßt.

### 3tägiger Ausnutzungsversuch.

| Einnahme | | Fett | N |
|---|---|---|---|
| 1. Tag | 1780 *g* Milch | 53·4 | 11·1 |
| | 50 *g* Butter | 47·0 | |
| | 180 *g* Weißbrot | — | |
| 2. Tag | 2500 *g* Milch | 60·0 | 13·4 |
| | 50 *g* Butter | 47·0 | |
| | 283 *g* Weißbrot | — | |
| 3. Tag | 2500 *g* Milch | 60·0 | 14·0 |
| | 50 *g* Butter | 47·0 | |
| | 283 *g* Weißbrot | — | |
| | Summe . . | 314·4 | 38·5 |

Ausscheidung durch Kot. Kot durch Karmin abgegrenzt, Kot frisch = = 246 *g*, Kot trocken = 55 *g*, enthaltend 3·507°/₀ N, 16·34°/₀ Fett. Mithin ausgeschieden 1·929 *g* N und 8·99 *g* Fett.

Bilanz.

| | |
|---|---|
| Einnahme an Fett = 314·4 | Einnahme an N = 38·5 |
| Ausgabe durch Kot = 8·99 | Ausgabe durch Kot = 1·93 |
| resorbiert = 305·41 *g* | resorbiert = 36·57 *g* |
| zu Verlust gegangen = **2·9**% Fett. | zu Verlust gegangen = **5·01**% N. |

## III. Eiweißstoffwechselversuche.

Unter den Eiweißstoffen stellt der Stickstoff den für sie am charakteristischsten elementaren Bestandteil dar. Da auf 100 *g* Eiweiß 16 *g* N entfallen, pflegt man aus dem N-Gehalt durch Multiplikation mit 6·25 auf den Eiweißgehalt zu schließen. Im Stoffwechselversuch beim Menschen werden die Endprodukte des in den eigentlichen Stoffumsatz gezogenen Eiweißes durch den Harn ausgeschieden (die N-haltigen Produkte der Fäzes werden dabei als nicht resorbierte Nahrungsschlacken des Eiweißes in Rechnung gestellt, die N-Mengen, die unter normalen Verhältnissen mit dem Schweiß, den Haaren, den Nägeln abgeschieden werden, dagegen vernachlässigt).

Die Form, in der der Stickstoff den Harn verläßt, ist völlig irrelevant, da für den Eiweißstoffwechsel lediglich die gesamte N-Menge des Harns in Frage kommt. Der Eiweißstoffwechselversuch beim Menschen hat also allgemein die Frage zu verfolgen, wie verhält sich die Menge des mit dem Harn ausgeschiedenen N zu der Menge des per os aufgenommenen N abzüglich des durch die Fäzes ausgeschiedenen N.

Wir stellen den N der Nahrung im allgemeinen stets als Eiweiß schlechthin in Rechnung, was natürlich nicht zulässig ist, wenn z. B. gleichzeitig N-haltige Produkte verfüttert werden, die nicht die molekulare Zusammensetzung des Eiweißes haben, z. B. Aminosäuren. In solchen Fällen kann aber auch nur eine Stickstoffbilanz gezogen werden.

Bei der Anstellung eines Eiweißstoffwechselversuches ist die Kenntnis einiger physiologischer Tatsachen wichtig, da davon die Durchführbarkeit des Versuches abhängig ist.

1. Bei völlig gleichmäßiger Kost ist die tägliche N-Ausscheidung des Harns unter normalen Verhältnissen eine gleichmäßige. Beträgt die N-Ausscheidung (durch Harn und Kot) ebensoviel wie die N-Einnahme, so befindet sich das Individuum im N-Gleichgewicht.

2. Beim Übergang von einer N-reicheren zu einer N-ärmeren Kost dauert es mehrere Tage, bis das Versuchsindividuum in N-Gleichgewicht kommt. Das gleiche ist der Fall beim Übergang von einer N-ärmeren zu einer N-reicheren Kost.

Der Organismus sucht sich also der Eiweißzufuhr anzupassen, wobei bei täglich wechselnden N-Mengen in der Nahrung die 24stündige N-Ausscheidung durchaus nicht dem innerhalb dieser Zeit eingenommenen Eiweiß-N zu entsprechen pflegt.

Dadurch wird es bei der Durchführung eines Eiweißstoffwechsels notwendig, dem Hauptversuche eine längere (mindestens 3—4 Tage lange) Vorperiode vorangehen zu lassen. Die Aufgabe dieser Vorperiode ist es mit einem Worte, bei dem betreffenden Versuchsindividuum Stickstoffgleichgewicht zu erzielen. Man kann sich übrigens die Aufgabe dadurch sehr erleichtern — z. B. bei Patienten in einem Krankenhause —, daß man 1—2 Tage vor dem Beginne des Stoffwechselversuches die 24stündige Urinmenge auf den Gesamt-N analysiert und die Eiweißzufuhr — sofern nicht ganz besondere Ziele erstrebt werden — nach der Größe der N-Ausscheidung (und zwar um 10% höher, weil auf die Kotverluste Rücksicht genommen werden muß) der letzten Tage bemißt: auf diese Weise kommt das Versuchsindividuum bereits in den ersten Tagen der Vorperiode in Stickstoffgleichgewicht und man hat zu gleicher Zeit den Vorteil, schon in der sogenannten Vorperiode eine gleichmäßige Stickstoffausscheidung vorzufinden.

3. Weiter ist für die Anstellung eines N-Stoffwechselversuches die Kenntnis der Tatsache wichtig, daß Überernährung und Unterernährung (das Kalorienbedürfnis zugrunde gelegt) bei sonst gleichbleibender Eiweißzufuhr die Größe der N-Ausscheidung durch den Harn zu beeinflussen vermag. Und zwar drückt Überernährung (meist nur auf kürzere Zeit) die N-Ausscheidung herab, wobei die der Nahrung zugelegten Kohlehydrate in der eiweißsparenden Wirkung den Fetten überlegen sind; Unterernährung führt zur Steigerung der N-Ausfuhr. Deshalb ist es unbedingt erforderlich, als Basis des Eiweißstoffwechselversuches das Versuchsindividuum in Kaloriengleichgewicht zu bringen.

4. Wird in einer Versuchsreihe weniger N ausgeschieden, so bedeutet diese Zurückhaltung von N durchaus noch nicht, daß dieser N als Eiweiß zum Ansatz gekommen ist, d. h. daß er das Protoplasma des Organismus vermehrt hat. Aus diesem Grunde spricht man auch bei einer positiven N-Bilanz im Eiweißstoffwechselversuch meist nur von N-Retention. Erst wenn gleichzeitig $P_2O_5$ und S in dem Verhältnis retiniert sind, wie sie in dem Körpereiweiß enthalten sind ($N : P_2O_5 = 6 : 1$, $N : S = 16 : 1$), ist man berechtigt, von Eiweißretention zu sprechen. Als Kontrolle dient der Vergleich des Körpergewichtes vor und nach dem Versuche, wobei indessen die Zunahme des Eiweißes durch sonstige Wasserverluste des Körpers verdeckt werden kann.

In gleichem Sinne darf man bei N-Verlusten in einem Eiweißstoffwechselversuch auch nicht ohne weiteres auf Einschmelzung von Protoplasma schließen.

5. Wenn in einer Versuchsreihe in einer Periode bei Kaloriengleichgewicht Stickstoffgleichgewicht erzielt worden ist und nunmehr in der Hauptperiode durch Zulage beispielsweise von Kohlehydraten N-Retention erzielt worden ist, so darf der Versuch mit diesem Hauptversuch nicht abschließen, sondern es muß diesem eine mehrtägige Nachperiode folgen, bei der das Individuum genau wie in der I. Periode auf Kaloriengleich-

gewicht eingestellt ist. Man wird dann meist sehen, wie der Gewinn der Hauptperiode an retiniertem N in der Nachperiode wieder verloren geht. Allgemeiner gesagt: Jedem Eiweißstoffwechselversuch, der in der Hauptperiode auf N-Retention abzielt, hat eine Nachperiode zu folgen, die der Vorperiode gleich angeordnet ist.

Von besonderer Wichtigkeit ist bei einem N-Stoffwechsel die tägliche Zufuhr der gleichen Flüssigkeitsmenge (in der gesamten Nahrung); verabsäumt man dies, so sind oft die täglichen Urinmengen, die ausgeschieden werden, recht wechselnd und damit auch die täglichen N-Mengen. Durch größere Wassermengen kann daher N aus dem Körper ausgeschwemmt werden. Man kann darum auch versuchen, wenn sich in einem Stoffwechselversuche Retention von N ergibt, durch einmalige oder mehrmalige Zufuhr von Wasser einen Teil des retinierten N zur Ausscheidung zu bringen *(Abderhalden)*.

Auf Grund der eben erwähnten physiologischen Verhältnisse und der allgemeinen Ausführungen über Stoffwechselversuche ergibt sich für den speziellen Fall der Plan, den man für einen Eiweißstoffwechsel aufzustellen hat, von selbst; nichts desto trotz möge hier in großen Zügen für einige prägnante, häufig wiederkehrende Fälle der Plan skizziert werden.

*a)* Aufgabe: Es soll untersucht werden, ob ein Individuum bei ausreichender Kalorienzufuhr sich mit einer mäßigen, den unteren Schwellenwert des Erhaltungseiweißes überschreitenden Eiweißmenge ins Gleichgewicht zu setzen vermag.

Die Versuchsperson wiegt 60 *kg*. Bettruhe. Durchführung des Versuches (zu analysieren: Nahrung auf N, Stuhl auf N, Urin auf N).

I. (Vor-)Periode, 4tägig. Kalorienzufuhr 60 × 30 = 1800. Eiweißzufuhr (größer als 60 × 0·6), etwa 40 *g*.

II. (Haupt-)Periode, 4tägig. Die gleiche Nahrung. In dem Falle, daß eine negative Bilanz eintreten sollte, fügt man eine III. Periode an mit Zulage von Kohlehydraten (100 K. H.) und eine IV. Periode, die den ersten beiden gleich beschaffen ist.

V. Periode, 4tägig. Die gleiche Nahrung unter Fortlassung der Kohlehydratzulage der III. Periode, nur 80 *g* Eiweiß, eventuell kann man bei wiederum negativer Bilanz die Eiweißzufuhr weiter vermehren (VI., VII. etc. Periode) oder aber die Kalorienzufuhr (Kohlehydrate, Fette) steigern. Schließen alle diese Versuche mit einer negativen N-Bilanz, so ist das Resultat, daß sich das Individuum unter keinen Bedingungen in Stickstoffgleichgewicht zu setzen vermag, indem es ständig aus seinem Organismus N abgibt („toxischer" Eiweißzerfall).

*b)* Aufgabe: Ist durch Zulage von Eiweiß zur Nahrung ein Eiweißansatz zu erzielen?

Die Versuchsperson wiege etwa 70 *kg*; Bettruhe. Durchführung (zu analysieren: Nahrung auf N, Stuhl auf N, Urin auf N).

I. (Vor-)Periode, 4tägig. Kalorienzufuhr 70 × 30 = 2100. Eiweißzufuhr 80 *g*.

II. Periode, 8tägig. Kalorienzufuhr die gleiche, Eiweißzufuhr 200 *g*.

III. Periode wie Periode I, 3tägig: nur tägliche Zulage von 3 *l* Wasser.

IV. Periode wie Periode I, 4tägig (keine Wasserzulage). (Zweckmäßig ist bei diesen Stoffwechselversuchen auch gleichzeitig ein $P_2O_5$- und S-Stoffwechsel.)

In ganz analoger Weise wie die eben skizzierten Versuche werden die Versuche durchgeführt, bei denen es sich um die Frage der Einwirkung von Medikamenten auf den Eiweißstoffwechsel handelt. In diesen Fällen hat man darauf besonders zu achten, daß die täglichen N-Ausscheidungen in den einzelnen Perioden möglichst gleich sind. Vor-, Haupt- und Nachperiode müssen sich völlig in der Nahrung gleichen, nur daß in der Hauptperiode das Medikament verabreicht wird, dabei kann man eventuell auch die Form der N-Kurve der täglichen Ausscheidungen verwerten.

Dann mögen noch der Versuche Erwähnung getan werden, bei denen es sich darum handelt, zu sehen, mit welcher Schnelligkeit irgend ein Eiweiß, beispielsweise Kasein oder Ovalbumin oder dgl., umgesetzt bzw. deren N zur Ausscheidung gelangt. Es empfiehlt sich dabei, die Kost in Vor-, Haupt- und Nachperiode ganz gleichmäßig zu halten und das zu untersuchende Eiweiß in der Hauptperiode (nur) an einem Tage zu superponieren bzw. diesen Versuch nach mehreren Tagen zu wiederholen. Dabei kann man unter Umständen den Urin statt 24stundenweise (in der Hauptperiode 3—6stundenweise) auffangen und jede Urinportion getrennt auf den N-Gehalt analysieren. (Für die Gesamtbilanz müssen natürlich die 24 Stundenwerte eingetragen werden.)

Schließlich sei noch des in der Klinik früher vielfach beschrittenen Weges gedacht, der in dem Vergleich eines Stoffwechselversuches an dem Versuchsindividuum (meist nur N-Analyse des Harns!) mit dem eines Gesunden besteht. Selbstverständlich sind allgemeine Gesichtspunkte, die aus einer Summe von Erfahrungen gewonnen sind, für die Beurteilung jedes Stoffwechselversuches maßgebend, es ist indessen nicht angängig, zu sagen, daß, wenn A auf eine bestimmte Nahrung mehr oder weniger Stickstoff ausscheidet, als das als gesund angesehene Individuum B auf dieselbe Nahrung, daß dann das Versuchsindividuum A einen pathologischen Eiweißstoffwechsel aufweist. Die Beurteilung eines Stoffwechselversuches ist eben nur möglich, wenn dieser absolut exakt aufgebaut und durchgeführt ist; die Schlußfolgerungen sind dann a priori gegeben. Auch die vielfach beliebte Art, als Basis für die Beurteilung eines Eiweißstoffwechselversuches vom Hungerstoffwechsel auszugehen und zu sagen, nach unseren Erfahrungen scheidet ein hungernder Mensch etwa am 10. oder 15. Krankheitstage so und soviel N aus, folglich weiß ein Kranker, der sich im Inanitionszustand befindet und dessen N-Ausscheidung, damit verglichen, größer ist, einen toxischen Eiweißzerfall aus, ist unzulässig, da gerade im Hungerzustand und vor allem bei chronischer Unterernährung individuell schwer übersehbare Verhältnisse mitspielen (Fettreichtum des Individuums, Einschränkung des Gesamtumsatzes etc.).

## IV. Kohlehydrat- und Fettstoffwechselversuche.

Mit relativ einfacher Methodik, d. h. ohne kompliziertere Apparate, läßt sich normalerweise beim Menschen kein Kohlehydrat- oder Fettstoffwechselversuch durchführen. Die Endprodukte des Kohlehydrat- und Fettstoffwechsels werden als $CO_2$ zum größten Teil durch die Atemluft ausgeschieden und deshalb ist das Auffangen der Atemluft Vorbedingung derartiger Stoffwechselversuche.

Unerlaubt ist es, den Kohlehydrat- bzw. Fettumsatz aus der Größe der Resorption einer bestimmten Nahrung erschließen zu wollen: Die resorbierten Kohlehydrate und Fette brauchen durchaus nicht völlig umgesetzt zu sein, ein Teil kann ja als Fett abgelagert sein bzw. es kann der Körper bei einer, sein Kalorienbedürfnis nicht ausreichend deckenden Zufuhr sein eigenes Körperfett in einem gewissen Maße in den Umsatz gezogen haben.

Trotzdem ist man unter gewissen, allerdings pathologischen Verhältnissen imstande, einen Kohlehydratstoffwechsel auf exakterer Basis durchzuführen, und zwar beim Diabetes mellitus. Hier wird ein Teil der mit der Nahrung zugeführten Kohlehydrate als Zucker (meist Dextrose, eventuell auch Lävulose, Maltose und andere Zucker) wieder mit dem Harn ausgeschieden. In einem solchen Falle pflegt man den Kohlehydratstoffwechselversuch so einzurichten, daß man die Menge der per os eingeführten Kohlehydrate mit den durch den Urin ausgeführten Kohlehydraten in Bilanz setzt; die Differenz der Ein- und Ausgabe wird dann als in den Umsatz gezogen angenommen.

Im allgemeinen pflegt man bei der Durchführung solcher klinisch häufig in Frage kommender Versuche auf die exakte Analysierung der Nahrung hinsichtlich ihres Kohlehydratgehaltes zu verzichten und den Kohlehydratgehalt der sonst exakt zu bereitenden und abzuwiegenden Nahrung nur nach den üblichen Tabellen, z. B. *Königs* Tabellen (l. c.), zu berechnen. Für die Mehrzahl der Fälle genügt das auch, indessen erfordert eine wirklich exakte Durchführung einer Versuchsreihe auch die Analysierung der Nahrung auf deren Gehalt an Kohlehydraten hin, wozu im übrigen meist wenig Analysen ausreichend sind (cfr. die in der Einleitung S. 997 entwickelten Gesichtspunkte).

Während man sodann beispielsweise bei einem N-Stoffwechselversuch stets den Kot-N zu analysieren hat, erübrigt sich bei derartigen Kohlehydratstoffwechselversuchen diese Forderung für den Kohlehydratgehalt der Fäzes, da im allgemeinen (außer der Zellulose) die Kohlehydrate völlig resorbiert werden (bzw. der nicht resorbierte Rest im Darm vergoren wird). Man kann darum die eingenommenen Kohlehydrate (bei nicht allzu großen Mengen von Kohlehydraten) auch insgesamt als resorbiert ansehen.

Die Bestimmung der Kohlehydrate im Urin soll möglichst auf titrimetrischem Wege (*Fehling, Knapp* etc.) ausgeführt werden, da die Bestim-

mung durch Polarisation oder Vergärung bei Anwesenheit linksdrehender Substanzen und Zucker bzw. unvergärbarer Zucker im Urin leicht zu Fehlern Anlaß gibt.

Im übrigen ist ein solcher Kohlehydratstoffwechsel unter gleichen Prinzipien durchzuführen wie ein Eiweißstoffwechselversuch, wobei man ebenfalls bei der Aufstellung der zu verabreichenden Nahrung vom Kalorienbedürfnis der zu untersuchenden Person ausgeht. Zu berücksichtigen ist dabei nur, daß auch Zucker durch den Harn in Verlust geht. Um die Größe dieses kalorischen Defizits muß natürlich die Kalorienzufuhr erhöht werden.

Will man in solchen Versuchen die tägliche Zuckerausfuhr mit der Einnahme vergleichen, so muß das Individuum längere Zeit auf eine konstante Kost eingestellt sein, genau so wie beim Eiweißstoffwechsel.

Für die Fälle, wo die Zuckerausfuhr die Einnahme übersteigt, wo also der Zucker aus anderen Stoffen (wahrscheinlich aus dem Eiweiß) gebildet werden muß, empfiehlt es sich, neben den Kohlehydraten auch den Stickstoff der Nahrung, der Fäzes und des Urins zu bestimmen.

Bleibt die tägliche Stickstoffzufuhr (ebenso wie die Kohlehydrat- und Fettzufuhr) durch eine längere Zeit eine konstante, so kann man diejenige Zuckermenge des Harns, die sich nicht aus den mit der Nahrung eingenommenen Kohlehydraten herleiten läßt, als aus dem Eiweiß entstanden ansehen. Man gelangt so zur Aufstellung eines Quotienten D : N (Dextrose zu Stickstoff).

Die Größe dieses Quotienten gibt ein gutes Maß ab für die Schwere der diabetischen Stoffwechselstörung; so steigt der Quotient bei sehr schweren Fällen von Diabetes mellitus mitunter bis auf den Wert von etwa 5 und mehr.

Hier sei nur noch hervorgehoben, daß es in schweren Fällen von Diabetes mellitus mitunter zum Auftreten abnormer Produkte im Harn (Aceton, Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure) und in der Atemluft (Aceton) kommt, deren Menge quantitativ zu bestimmen ist. Während die mit der Atemluft ausgeschiedene Acetonmenge meist keine sehr große und deshalb eher zu vernachlässigen ist, können die im Urin ausgeschiedenen Acetonkörper sehr erhebliche Mengen darstellen. Man bestimmt im Urin Acetessigsäure + Aceton gemeinsam als Aceton nach *Messinger-Huppert*, β-Oxybuttersäure nach *Magnus-Levy* u. a. Die Berechnung der β-Oxybuttersäure aus der Linksdrehung des vergorenen Harns ist nicht einwandfrei. Man kann die Menge der Acetonkörper in Vergleich setzen mit der Menge des eingenommenen Fettes.

Hier sei noch erwähnt, daß es sowohl im Hunger wie bei einer Nahrung, aus der die Kohlehydrate ausgeschaltet sind, zum Auftreten derartiger abnormer Produkte kommt, deren Menge mitunter nicht unerheblich ist und die deshalb bei derartigen Stoffwechselversuchen in Berücksichtigung gezogen werden muß.

## V. Nukleinstoffwechselversuche.

Als Quelle für die Purine des Harns (Harnsäure + Purinbasen, deren Verhältnis im Harn unter normalen Verhältnissen etwa 10 : 1 ist) kommen zwei in Betracht, einmal die Fleischnahrung (Nahrungsnukleine), welche stets je nach ihrer Art mehr (Drüsen, wie Kalbsbries, Leber etc.) oder weniger (Muskelfleisch) Purine enthält, sodann die Zellen des Organismus selbst, welche sich in beständiger Mauserung befinden und darum dauernd Material zur Harnsäurebildung liefern. Danach unterscheidet man die entstandene Harnsäure als exogene (der Nahrung entstammend) und als endogene (dem eigenen Zellstoffwechsel entstammend). Der Harnsäuregehalt des Urins gibt also ein Maß für die Zufuhr von Purinen in der Nahrung einerseits und für die Lebhaftigkeit des Zellkernstoffwechsels andrerseits.

Purinstoffwechselversuche, die den Zweck haben, die Größe der Harnsäureausscheidung bzw. Purinausscheidung unter bestimmten Bedingungen kennen zu lernen, müssen stets von den endogenen Harnsäure- bzw. Purinwerten ausgehen. Um die Größe der endogenen Harnsäure bzw. Harnsäure + Purinbasen kennen zu lernen, ist es erforderlich, dem Versuchsindividuum (längere Zeit hindurch) eine purinfreie Diät zu verabfolgen. Unter einer purinfreien Diät versteht man eine solche, bei der alle Vorstufen der Harnsäure, also alle Nukleine, strikte ferngehalten sind. (Das schließt natürlich nicht aus, daß man Eiweiß mit der Kost verabreicht, z. B. Milcheiweiß, Eiereiweiß u. dgl.)

Als purinhaltig anzusehen sind die Fleisch- und Fischsorten aller Art, ferner junge Gemüse; hier sei eine purinfreie Kost angeführt, wie sie überall leicht zu beschaffen und vor allen Dingen auch in Spitälern gut durchzuführen ist: $1^1/_2$ *l* Milch, 150 *g* Weißbrot, 50 *g* Butter, 100 *g* Speck, 150 *g* Gemüse (ca. 10 *g* N und ca. 2300 Kalorien).

Als endogener Harnsäure- bzw. Purinbasenwert wird nun die innerhalb 24 Stunden unter der purinfreien Kost mit dem Urin ausgeschiedene Harnsäure- bzw. Purinbasenmenge angesehen, wobei man, nachdem das Versuchsindividuum bereits einige (mindestens 3) Tage zuvor schon auf purinfreie Diät gesetzt worden war, den Durchschnitt einer größeren Reihe von Harnsäure- bzw. Purinbasenwerte als endogenen Wert bezeichnet.

Im allgemeinen ist der Nukleinstoffwechsel nicht abhängig vom Gesamtstoffwechsel, doch empfiehlt es sich bei der Durchführung eines Purinstoffwechselversuches, höhere Grade von Über- oder Unterernährung zu vermeiden, da dadurch der endogene Harnsäurewert mitunter beeinflußt wird.

Versuche über den exogenen Harnsäurestoffwechsel werden gewöhnlich angestellt in der Absicht, festzustellen, mit welcher Schnelligkeit und in welchem Umfange mit der Nahrung verfütterte Purinkörper in Harnsäure übergeführt bzw. als Purinbasen wieder ausgeschieden werden.

Des quantitativen Begriffes wegen ist es aber notwendig, zur Verfütterung nur solche Körper zu nehmen, deren Purinbasengehalt exakt bestimmt bzw. bestimmbar ist. (Daher sind Versuche mit Verfütterung von

Kalbsmilch, Leber, Nieren für die Beurteilung der quantitativen Verhältnisse nahezu wertlos, sofern nicht der Gehalt der verfütterten Materie an Purinen jeweils bestimmt wird.) Im allgemeinen empfiehlt es sich, eine reine Nukleinsäure (z. B. Hefenukleinsäure [1]) oder α-Thymonukleinsäure [2]) zu diesen Versuchen zu verwenden (eventuell reine Basen, z. B. Adenin, Xanthin).

Um zu zeigen, wie derartige Versuche durchzuführen sind, sei hier ein praktisches Beispiel angeführt.

| Tag Nr. | Urinmenge | Gesamt N | Harnsäure in Gramm | Harnsäure-N | Basen N | Purin N | U N : Basen N | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | I. Periode (Vorperiode). | | | | |
| 1 | 1860 | 8·135 | 0·3717 | 0·1239 | 0·0157 | 0·1396 | 7·9 | Gleichmäßige purinfreie |
| 2 | 2000 | 8·460 | 0·3393 | 0·1131 | 0·0179 | 0·1310 | 6·3 | Kost mit ca. 10 *g* N pro die |
| 3 | 2200 | 8·324 | 0·4323 | 0·1441 | 0·0161 | 0·1602 | 9·0 | |
| Durchschnitt | | 8·286 | 0·3811 | 0·1270 | 0·0166 | 0·1436 | 7·7 | — |
| | | | | II. Periode (Hauptperiode). | | | | |
| 4 | 2400 | 9·641 | 0·7805 | 0·2602 | 0·0163 | 0·2765 | 16·0 | Zulage von 10 *g* hefenukleinsaurem Na = 1·335 *g* N; und 0·72 *g* Purin-N. |
| 5 | 2000 | 9·464 | 0·9634 | 0·3211 | 0·0185 | 0·3396 | 17·4 | Desgl. |
| 6 | 2000 | 9·688 | 0·9408 | 0·3136 | 0·0134 | 0·3270 | 23·4 | Desgl. |
| Durchschnitt | | 9·598 | 0·8949 | 0·2983 | 0·0161 | 0·3144 | 18·9 | — |
| | | | | III. Periode (Nachperiode). | | | | |
| 7 | 2500 | 8·420 | 0·3780 | 0·1260 | 0·0154 | 0·1414 | 8·2 | |
| 8 | 2000 | 8·330 | 0·3531 | 0·1177 | 0·0161 | 0·1338 | 8·6 | — |
| 9 | 2200 | 8·355 | 0·3936 | 0·1312 | 0·0172 | 0·1484 | 7·6 | — |
| Durchschnitt | | 8·368 | 0·3749 | 0·125 | 0·0162 | 0·1412 | 8·1 | — |

Berechnung:

Gesamt-N-Ausscheidung der Vorperiode = 24·859 *g*
" " " Hauptperiode = 28·793 *g*
Mehrausscheidung in der Hauptperiode = 3·934 *g*

Die Zulage an Nahrungs-N in Form von 10 *g* hefenukleinsaurem Natrium beträgt in der Hauptperiode 4·005 *g*; dieselbe ist also quantitativ im Urin als N wieder ausgeschieden.

Gesamtharnsäure-N-Ausscheidung der Vorperiode = 0·3811 *g* (endogener Wert)
" " " Hauptperiode = 0·8949 *g* (endogene + exogene Harnsäure)
Mehrausscheidung der Hauptperiode = 0·5138 *g* (exogener Wert)

[1]) Käuflich von Boehringer in Mannheim.

[2]) Wird aus Kalbsthymus dargestellt.

Die Menge des Nahrungspurin-N in den verabreichten 10 *g* hefenukleinsaurem Natrium beträgt 2·16 *g*. Es sind also davon 23·8% als Harnsäure-N ausgeschieden worden. Die Purinbasenausscheidung ist in beiden Perioden gleich groß; es ist also die ganze Menge der zugeführten Nahrungspurine in Harnsäure umgesetzt worden, wovon jedoch nur 23·8% als solche ausgeschieden worden ist, während der Rest bis zum Harnstoff abgebaut und in dieser Form abgegeben wurde.

Die Nachperiode verläuft ziemlich genau wie die Vorperiode und gibt also die endogenen Werte. Der Einfluß der Purinzufuhr erstreckt sich nicht mehr auf dieselbe.

Wenn man Nukleinsäure verfüttert, empfiehlt es sich, in der dazu gehörigen Periode den Kot auf seinen Purinbasengehalt zu untersuchen, da ja immerhin die Möglichkeit vorliegt, daß die Nukleinsäure nicht völlig resorbiert worden ist.

Methodisch sei für derartige Versuche besonders die Harnsäure- und Purinbasenbestimmung nach *Krüger* und *Schmidt* empfohlen.

## VI. Salzstoffwechsel.

Die Durchführung eines Salzstoffwechselversuches erfordert vor allem anderen die allergrößte Exaktheit der Analysierung sowohl der eingenommenen Nahrung wie der Ausscheidungen (Urin und Kot). Während z. B. bei einem Eiweißstoffwechsel zur Not die Stickstoffwerte, z. B. von Fleisch, sich aus Tabellen berechnen lassen, ist die Berechnung der Salze aus Tabellen völlig unzulässig. Jeder Salzstoffwechsel, bei dem die Nahrung nicht völlig exakt analysiert ist oder bei dem etwa die Fäzesanalyse fehlt oder dgl., macht den Versuch völlig unbrauchbar.

Andrerseits ist die Analysierung der Nahrung auf den Gehalt an Aschenbestandteilen schwierig und zeitraubend; man wird daher versuchen, die Nahrungsverhältnisse so einfach zu wählen, daß man mit möglichst wenig Analysen auskommen kann, z. B. Analysierung einer Büchse Trockenmilch, die für 4 Tage etwa reicht, Analysierung eines Stück Fleisches, das für mehrere Tage reicht etc. (vgl. die in der Einleitung S. 997 entwickelten Gesichtspunkte).

Die Salzstoffwechselversuche sind ebenfalls in Perioden durchzuführen, wobei man innerhalb dieser Periode die Bilanz aus der Einnahme (Nahrung) mit den Ausgaben (Harn und Kot) zieht. Der Periodenbau richtet sich natürlich nach dem mit dem Versuche verfolgten Zweck. Auch für den Salzstoffwechselversuch empfiehlt es sich bei der Aufteilung der Kost von dem Kalorienbedürfnis der Nahrung auszugehen.

Die Salzstoffwechselversuche werden nun gewöhnlich nur für wenige Salze jeweils durchgeführt, wobei sich oft aus physiologischen Rücksichten kombinierte Untersuchungen verschiedener Salze als zweckmäßig ergeben. Beispielsweise ist es ratsam, wenn man einen Kalkstoffwechsel durchführen will, gleichzeitig auch den Magnesium- und $P_2O_5$-Umsatz zu verfolgen. Mit der Durchführung eines Schwefelstoffwechsels verbindet man zweckmäßig die Durchführung des N-Stoffwechsels, da der Schwefel hauptsäch-

lich in organischer Form (an Eiweiß gebunden) eingeführt wird und sein Umsatz einen guten Indikator für den Eiweißumsatz abgibt. Den Natriumstoffwechsel verbindet man mit dem Kalistoffwechsel, den Chlorstoffwechsel eventuell mit dem Natriumstoffwechsel u. dgl. m.

Bezüglich des Chlorstoffwechsels sei noch darauf aufmerksam gemacht, daß in der Klinik das Kochsalz unter Umständen als Indikator für die Funktionstüchtigkeit der Nieren gilt. Man pflegt dabei von einer sog. kochsalzarmen Diät auszugehen (Eier, ungesalzene Butter, ungesalzenes Weißbrot, ungesalzene Gemüse), bei der der betreffende Patient täglich etwa 2—3 *g* Kochsalz ausscheidet. Gibt man dann an einem Tage 10 oder 20 *g* Na Cl, so wird ein nierengesundes Individuum diese Mehrzulage von Kochsalz innerhalb 24—48 Stunden ausscheiden, während das nierenkranke Individuum einen Teil der Chloride unter Umständen im Körper zurückbehält bzw. die Ausscheidung von Chloriden langsam vollziehen wird. Zu derartigen, immerhin groben Versuchen, genügt die Bestimmung der Chloride des Harns; man wird indessen solche Versuche nicht als exakte Salzstoffwechselversuche ansprechen können; jedenfalls zeigen sie aber, daß auch bei den Salzen vermehrte Ausscheidung eines Salzes wie eine Retention unter Umständen nur die einfache Ausschwemmung eines in den Säften aufgestapelten Salzes bzw. dessen einfache Aufstapelung bedeuten können.

Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß Schwefel und Phosphor in der Nahrung (sowohl in der vegetabilischen wie animalischen) in zwei verschiedenen Formen vorkommen; einmal (und zum größten Teile) in organischer Bindung und dann in anorganischer Bindung. Aus diesem Grunde dürfte es sich in Zukunft empfehlen, bei Stoffwechselversuchen diese beiden getrennt in der Nahrung zu bestimmen.

Zur Methodik der Aschenanalysen cfr. Bd. I, S. 372.

## VII. Wasserstoffwechsel.

Einen exakten Wasserstoffwechsel durchzuführen gelingt nur unter Benutzung von Apparaten, in denen die Wasserdampfabgabe der Atemluft und der Haut bestimmt werden kann. Die Urinmenge an sich stellt nur einen aliquoten Teil der gesamten, vom Organismus ausgeschiedenen Wassermenge dar.

Man wird trotzdem unter gewissen konstanten Verhältnissen, bei bettlägerigen Personen, die nicht fiebern und im temperaturkonstanten Raume sich aufhalten, die Urinmenge als einen brauchbaren Faktor des Wasserstoffwechsels ansehen können. Stoffwechselversuche in dieser Beziehung können natürlich nur auf die Nieren bezogen werden: Man untersucht beispielsweise die Wirkung eines Diuretikums auf die Harnmenge (an normalen oder pathologischen Nieren) oder untersucht den Einfluß großer Wassermengen auf die Schnelligkeit und Größe der Urinausschei-

dungen. In den meisten Versuchen erübrigt sich die genaue Trockenanalyse der Nahrung zur Berechnung der zugeführten Flüssigkeit: Man kommt mit den tabellarischen Durchschnittsanalysen aus. Andrerseits kann man natürlich auch nur aus sehr groben Änderungen der Urinmengen (bei gleichbleibender Nahrung) irgend welche Schlüsse ziehen. Ergibt sich in einem Versuche, daß bei Zufuhr einer größeren Wassermenge relativ wenig Urin ausgeschieden wird, so ist der Schluß, daß diese im Körper zurückgehalten wird, zwar naheliegend, aber noch nicht auf alle Fälle berechtigt, sondern erst dann, wenn das Körpergewicht sich im gleichen Sinne ändert bzw. schon Ödeme auftreten oder aufgetreten sind.

## 3) Stoffwechseluntersuchungen am Säugling.

Von **Leo Langstein**, Berlin.

Als geeignet zur Untersuchung des Stoffwechsels im Säuglingsalter kann nur eine Methodik bezeichnet werden, welche gestattet, Harn und Kot voneinander getrennt und quantitativ durch längere Zeiträume (zumindest einige Wochen) aufzufangen, ohne daß Allgemeinbefinden und Stimmung des Kindes durch die erforderlichen Apparate und Prozeduren alteriert werden, mit anderen Worten: ohne daß die Stoffwechseluntersuchung als solche eine den Zustand des Kindes in irgend einer Weise beeinträchtigende Komponente bildet.

Daß Harn und Kot bis zur Verarbeitung in unzersetztem Zustande erhalten werden müssen, die Genitalien des Kindes vor jeglicher Schädigung (Präputial- oder Skrotalödem) zu bewahren sind, sind wohl selbstverständliche, die eingangs skizzierten ergänzende Forderungen.

Unter den zahlreichen beschriebenen Original- und modifizierten Methoden halten nur zwei der Kritik stand; ihre Verbesserung erscheint kaum möglich, bzw. nötig, so daß sie an dieser Stelle mit gutem Gewissen auf Grund reichlicher eigener Erfahrung empfohlen werden können.

Die eine, ausgezeichnet durch ihre Einfachheit, rührt von *W. Freund*[1]) her; es ist jene, nach welcher die Breslauer Kinderklinik ihre zahlreichen Stoffwechseluntersuchungen vorgenommen hat.

Ich gebe die von *Freund* stammende Skizze und Beschreibung des Untersuchungsmodus in folgendem wieder.

Der Säugling liegt im Bett auf einem Kissen, welches nur seinem Kopf und Rumpf zur Unterlage dient, während Anus und untere Extremitäten darüber hinausragen und durch halstuchartig zusammengelegte, um Knie und Unterschenkel geschlungene Windeln von den Bettstangen her in leicht gespreizter Stellung erhalten werden (Fig. 273 *A*). Der untere Teil des Rumpfes liegt auf einem Stück Guttaperchapapier, welches über den Rand des Kissens auf das ca. 15 *cm* tiefere Niveau der Matratze hinabreicht und sich daselbst noch etwa 20—30 *cm* weiter

[1]) *W. Freund*, Chlor und Stickstoff im Säuglingsorganismus. Jhb. f. Kinderheilk. Bd. 48. S. 137 (1898).

erstreckt. Auf dieses Papier entleert das Kind seinen Stuhl. Das Kind trägt einen bruchbandartig angelegten Gurt mit einem runden, dem Penis zum Durchtritt dienenden Ausschnitt, welcher sich in eine den Penis umgebende Gummimanschette fortsetzt. In diese wird der Hals eines Urinrezipienten derart hineingeschoben, daß der ganze Penisschaft sich im gläsernen Rezipienten befindet. (Form und Maße des Rezipienten sowie die Anordnung desselben am Gurt sind aus den Skizzen *B* und *C* der Fig. 273 ersichtlich.) Der Rezipient kann infolge der erwähnten Niveaudifferenz zwischen Kissen und Matratze soweit gesenkt werden, daß einerseits ein Zurückfließen des Urins unmöglich ist, andrerseits doch der Boden des Rezipientenkolbens noch frei über dem Guttaperchapapier schwebt. In dieser Lage wird der Rezipient aufgehängt an einem die Matratze quer überspannenden Drahtbügel, der außerdem der Bettdecke zur Stütze dient und das Herabsinken derselben auf das Guttaperchapapier verhindert. Rezipient und Papier können ohne Schwierigkeit gewechselt werden, wiewohl zugestanden werden muß, daß zum Rezipientenwechsel eine gewisse Einübung gehört, die sich besonders darauf zu richten hat, daß beim Einsetzen des Halses eine Läsion des Penis oder gar ein Einklemmen des Präputiums vermieden wird. In kurzer Zeit läßt sich jedoch eine solche Fertigkeit erreichen, daß jene Gefahren völlig außer dem Bereich der Möglichkeit liegen. Ähnliches gilt von der Anlegung des Gurtes, der auf der bloßen Haut liegt, ohne daß es bei genügender Sorgfalt zu Veränderungen derselben kommt. Nach Belieben können Wägungen der Kinder mit Papier und Rezipienten, deren Gewicht vorher festgestellt ist, vorgenommen werden. Brustkinder werden mit beiden herausgenommen und angelegt. Von dem Guttaperchapapier läßt sich der Stuhl leicht mit destilliertem Wasser quantitativ herunterspülen.

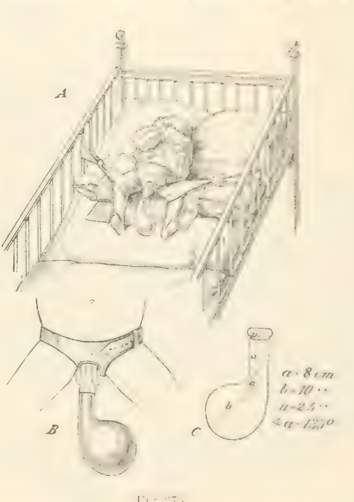


Fig. 273.

Die von *Freund* der Methodik nachgerühmten Vorzüge, die sowohl in ihrer Einfachheit liegen als darin, daß sie nur eine geringe Belästigung der Kinder mit sich bringen, bestehen unzweifelhaft zu Recht. Doch gebe ich dem im Folgenden beschriebenen Verfahren den Vorzug, da es sich für länger ausgedehnte Stoffwechselversuche besser eignet.[1])

[1]) Vielleicht empfiehlt sich eine Modifikation des Rezipienten, die sich mir bei einem Stoffwechselversuch an einem Fall von infantilem [illegible] als äußerst brauch-

Dieses Verfahren, das gegenwärtig in der *Heubner*schen und *Finkelstein*schen Anstalt ausschließlich zur Anwendung gelangt, läßt sich allerdings nicht mit ganz so primitiven Mitteln durchführen wie das ersterwähnte, bietet aber den Vorteil einer bequemeren Lagerung des Säuglings ohne der Gefahr der Abkühlung, so daß die Stoffwechselversuche mehrere Wochen lang durchgeführt werden können, ohne das Befinden des Säuglings zu beeinträchtigen.[1]) Eine derartige Verlängerung ist aber

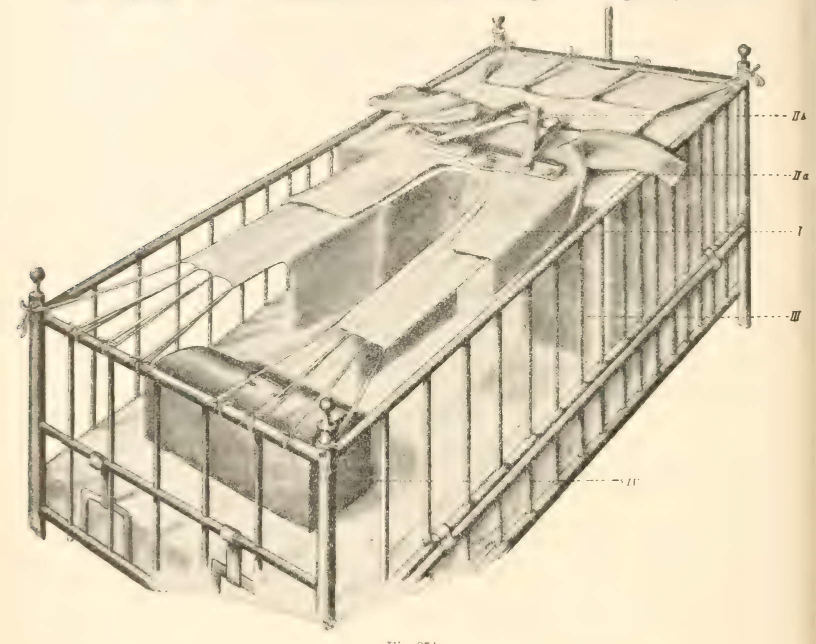



Fig. 274.

Das Versuchsbett.

*I* = Windelhose und Jacke 58 *cm* lang; *IIa* = Brustgurt 56 *cm*; *IIb* = Schultergurt 39 *cm*; *III* = Keilkissen 24 *cm* hoch; *IV* = Wärmekasten 32 *cm* lang und 15 *cm* hoch.

---

mäßig erwiesen hat. (*Hougardy-Langstein,* Stoffwechselversuch an einem Fall von infantilem Myxödem. Jhb. f. Kinderheilk. N. F. Bd. **61**. H. 4. S. 633 [1905].) Sie besteht darin, daß der Hals des gläsernen Rezipienten mit dessen Körper durch einen Schliff verbunden wird. Es ist auf diese Weise nicht nötig, bei Wechsel des Rezipienten diesen jedesmal aus dem Gummirohr zu ziehen, wobei leicht Einklemmungen der Haut und dadurch Ödem zustande kommen können, insbesondere, wenn nicht immer eine sorgfältige Hand zur Stelle ist. Bei nach obiger Angabe konstruiertem Rezipienten ist dies nicht zu befürchten, da das gläserne Ansatzstück beständig mit dem Gummirohr in Verbindung bleibt.

[1]) Es gelang mir, gemeinsam mit Kollegen *Niemann*, auf diese Weise einen 25tägigen Stoffwechselversuch an einer Frühgeburt vom ersten Tage des Lebens an ohne Störung durchzuführen.

für die Beantwortung gewisser Fragen wie z. B. des Mineralstoffwechsels, durchaus notwendig: ein Postulat, dem bei der Erforschung dieser Materie seitens mancher Pädiater bisher leider nicht in der wünschenswerten Weise Rechnung getragen wird.

Die Vorrichtung, die zur Ausführung der langfristigen Stoffwechselversuche notwendig ist, haben *Bendix* und *Finkelstein*[1]) angegeben. Sie ist durch die folgenden Abbildungen anschaulich.[2])

Das Kind ruht auf einem im Bett ausgespannten, gegen das Kopfende zu durch ein oder mehrere Kissen unterstützten starken Tuch, das

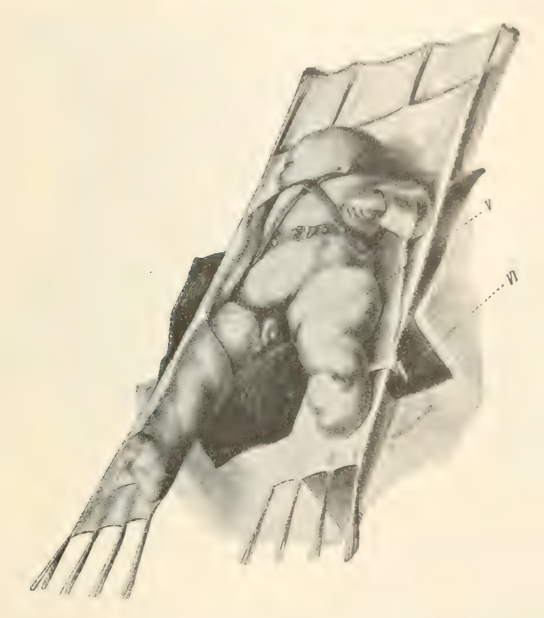



Fig. 275.
Erster Akt der Vorbereitung zum Versuch.
*I* = Watte; *II* = Guttaperchaunterlage 45 *cm* lang, [illegible] *cm* breit.

sich in zwei Fußteile auflöst, die durch Aufschlagen und Feststecken zweier innerer Zipfel zu dütenförmigen Röhren für die Beine umgestaltet werden. Auf dieses Leintuch ist eine wollene Hemdhose aufgenäht. Analausschnitt der Hose und Spalt des Tuches müssen mit ihren Spitzen genau

[1]) *Bendix* und *Finkelstein*, Ein Apparat für Stoffwechseluntersuchungen am Säugling. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 42 (1900).

[2]) Nach Originalzeichnungen unter Benutzung von von *Ludwig F. Meyer* angegebenen Maßen.

korrespondieren.[1] Das folgende Bild zeigt, wie vor Anbringung der Umgürtungen und der Umhüllungen für die Beine diese ebenso wie der Körper des Kindes in dicke Lagen von Watte gepackt werden. Zugleich wird hier veranschaulicht, wie zum Zwecke des Auffangens der Fäzes eine Unterlage von Guttaperchapapier angebracht wird.

Die Fig. 275 zeigt die Anbringung des Rezipientengurtes mit Rezipienten, die Art, wie das Ansatzstück des Rezipienten in die für das Auffangen des Harns bestimmte Flasche ragt und die Guttapercha-Unter-

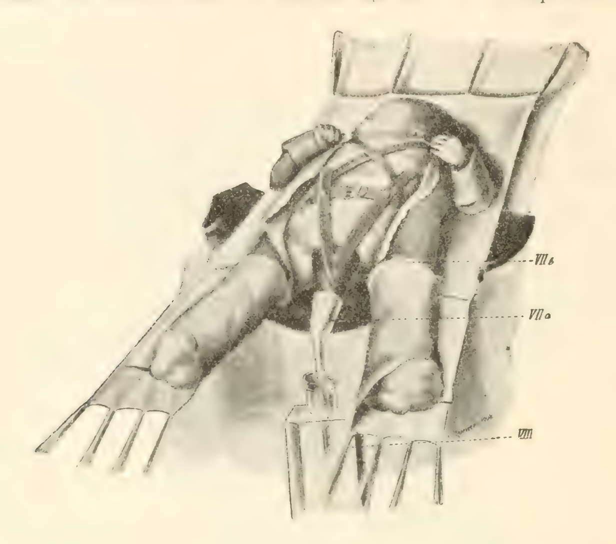



**Fig. 276.**

*VIIb* = Rezipientengurt 16 *cm* im Durchmesser, 25 *cm* lang; *VIIa* = Rezipient 16 *cm* im Durchmesser, 32 *cm* breit; *VIII* = Urinflasche 18 *cm* hoch.

lage zu einem Beutel gefaltet und mit Sicherheitsnadeln befestigt wird, um auch flüssigen Kot ohne jeglichen Verlust auffangen zu können.

Fig. 277 und 278 zeigen das Kind im Versuch und den Harnrezipienten mit der Lagerung des Penis in ihm in Profilansicht. Der Harnrezipient besteht aus einer Glasampulle, die unter einem entsprechenden Winkel in ein Glasrohr ausläuft; über der Glasampulle befindet sich der zur Aufnahme des Penis dienende Gummiansatz, in den die zur Befestigung dienenden Gurtstreifen übergehen. Die Form der Urinflasche ist beliebig; sie soll womöglich dickwandig und schwer zerbrechlich sein (Fig. 277 und 278).

---

[1]) Die gesamte erforderliche Apparatur ist bei Paul **Altmann**, Fabrik chemischer und bakteriologischer Apparate, Berlin NW., Luisenstr. 47, zu beziehen.

Wenn ich nicht anstehe, die eben beschriebene Art der Untersuchung des Säuglingsstoffwechsels als eine ideale zu bezeichnen, so schöpfe ich dazu die Berechtigung aus der Erfahrung, daß es auf diese Weise sowohl möglich ist, den Stoffwechsel äußerst lebhafter kräftiger Kinder gegen Ende des ersten Lebensjahres zu untersuchen, wie auch den von äußerst labilen Frühgeburten, ohne daß deren Wärmehaushalt oder Zustand leidet.

Wenn sich auch in erster Linie Knaben als geeignete Versuchsobjekte erweisen, so gelingt es bei einiger Aufmerksamkeit doch auch, mit dem

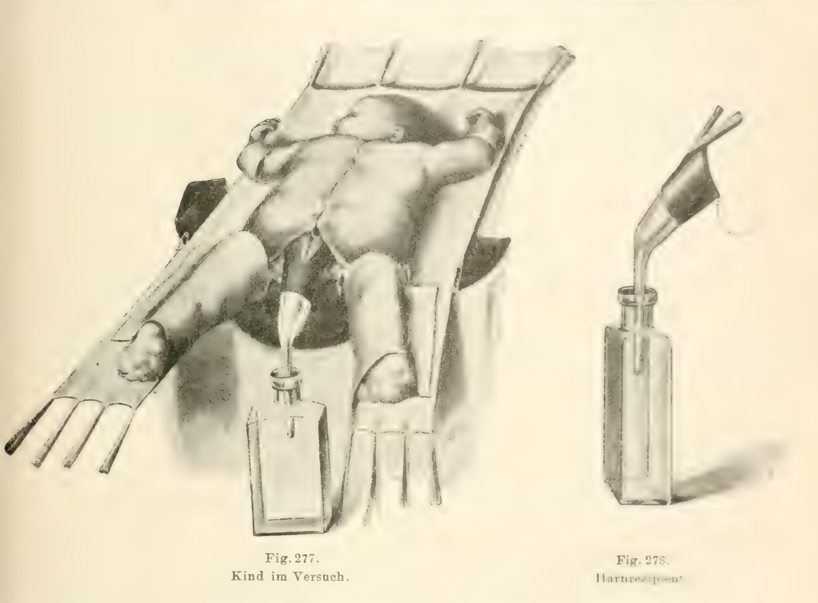


Fig. 277.
Kind im Versuch.

Fig. 278.
Harnrezipient.

geschilderten Apparat den Stoffwechsel von weiblichen Säuglingen zu untersuchen. Allerdings sind für die Stoffwechseluntersuchung weiblicher Säuglinge auch besondere Modifikationen angegeben, wie von *J. A. Schabad*[1], dessen Apparat sich im übrigen jedoch kaum von dem vorstehend geschilderten, auf den Prinzipien von *Bendix-Finkelstein* basierenden unterscheidet.

*Freund* hat einen Harnfänger für weibliche Säuglinge angegeben, dessen Beschreibung und Abbildung, die er mir freundlichst zur Verfügung gestellt hat, ich im folgenden wiedergebe.

---

[1]) *J. A. Schabad*, Ein Apparat zum Sammeln von Harn und Kot für Stoffwechseluntersuchungen bei Kindern. Arch. f. Kinderheilk. Bd. 48. H. 5/6. S. 402 (1908); siehe daselbst auch Literatur.

„Das Anlegen des Rezipientenkörpers erfolgt mittelst eines Gummibandes, dessen Befestigung aus Fig. *A* ersichtlich ist. Die abgeschnittenen oberen Enden laufen in der Richtung der Darmbeinkämme, um sich dann hinten über der Kreuzbeingegend zu vereinigen. Die unteren freien Enden verlaufen wie die Schenkelriemen eines Bruchbandes und werden an dem gurtartigen Teil des Bandes mit Haken und Ösen unter angemessener Spannung befestigt. Die Lagerung des Kindes ist dabei die gleiche, wie sie von mir für den Stoffwechselversuch beim männlichen Säugling seinerzeit angegeben worden ist (siehe Fig. 273).

Der Harnfänger für weibliche Säuglinge wird naturgemäß nur in besonderen Fällen Verwendung finden, da der Rezipientenkörper individuell passend hergestellt werden muß (es sei denn, daß man über einen großen Vorrat verschiedener Größen und Formen verfügt). Die Herstellung ist indessen nicht besonders schwierig. Ich forme zunächst einen Rezipienten-

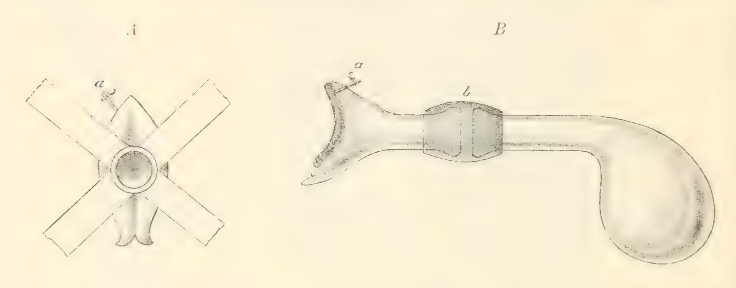



Fig. 279.

Harnfänger für weibliche Säuglinge.

*A.* Von vorn (ohne Rezipientenkolbe). *B.* Von der Seite mit angelegtem Rezipienten.
*a* = Aufblasbarer Gummiring. *b* = Gummiverbindung.

körper aus Plastilin (Deutscher Plastilin, Marke Sonnenrose), der sich den Dimensionen von Introitus und Formen des Versuchskindes gut anpaßt, und überziehe ihn alsdann mit Celluloid in möglichst starker Schicht. Dies geschieht durch mehrfach wiederholtes Übergießen bzw. Bepinseln mit einer Lösung von Celluloid (in Aceton). Nach 1—2 Tagen ist dann der plastische Kern von einem genügend starren Celluloidmantel umgeben, der Apparat gebrauchsfähig. Ovale Gummiringe von verschiedenen Größen können leicht vorrätig gehalten werden; es empfiehlt sich, sie auf der Seite, mit der sie der Haut der großen Labien angedrückt werden, mit Wildleder zu bekleben, das von der Haut außerordentlich gut vertragen wird, während Gummi bisweilen reizend wirkt."

Vor den Erörterungen, in welcher Weise die Ernährung des Säuglings während des Versuches vollzogen werden soll, je nachdem es sich um einen Stoffwechselversuch bei natürlicher oder bei künstlicher Ernährung handelt, seien noch einige Bemerkungen über die Besorgung des Kindes

während der Stoffwechselperiode und die mit dem Harn und Kot vor der Verarbeitung vorzunehmenden Manipulationen gestattet.

Es ist notwendig, das Kind mindestens einmal täglich seiner Umhüllungen zu entkleiden und genau nachzusehen, ob sich nirgends wunde Stellen oder Druckstreifen durch ungenügende Polsterung gebildet haben. Je sorgfältiger das Kind in Watte gepackt wird, um so eher wird sich ein derartiges Vorkommnis vermeiden lassen. Daß auch die Genitalien genau nachgesehen werden müssen, um ein beginnendes Präputial- oder Skrotalödem nicht zu übersehen, ist selbstverständlich; denn ein solches würde die Fortsetzung des Versuches verbieten.

Während das Kind besichtigt wird, muß selbstverständlich dafür Sorge getragen werden, daß nicht gerade in dieser Zeit entleerter Harn resp. Kot verloren gehen und dadurch die Mühen eines langfristigen Stoffwechselversuches illusorisch gemacht werden. Da, um den Zustand der Genitalien nachzusehen, nur die momentane Lüftung des Rezipienten notwendig ist, ist ja ein Verlust des Harns bei geschicktem Vorgehen kaum zu befürchten. Um keinen Kot zu verlieren, wird man das Kind auf der Guttaperchaunterlage belassen. Sollte es notwendig werden, den Rezipienten für längere Zeit beiseite zu lassen, so kann man währenddessen ein Erlenmeyerkölbchen mit ein paar Heftpflasterstreifen vor dem Genitale befestigen.

Während des Versuches das Kind zu baden empfiehlt sich nicht, da dabei Verluste an Harn und Kot fast unvermeidbar sind; die tägliche Waschung erfüllt vollständig den gleichen Zweck.

Es ist eine selbstverständliche Forderung der Versuchsanordnung, daß der Harn unzersetzt erhalten wird. Vor der Zersetzung schützt ihn bei der geschilderten Methodik die Tatsache, daß er nur mit Glas und nicht mit Gummi oder Kautschuk in Berührung kommt. (Alle Methoden, die diese Berührung nicht vermeiden, müssen von vornherein die größten Bedenken erregen.) Um den Urin im Auffangegefäß unzersetzt zu erhalten, hat man die Anwendung antiseptischer Mittel, Thymol, Chloralhydrat, empfohlen; gegen die beiden genannten ist nichts einzuwenden; es genügt, einen kleinen Kristall in den Rezipienten zu geben. Chloroform wird besser vermieden, da die sich entwickelnden Dämpfe zur Reizung der Haut und Schleimhaut des Genitales Veranlassung geben. Sobald sich in dem Rezipienten Harn befindet, was alle ein bis zwei Stunden der Fall ist, wird er gegen einen leeren umgewechselt und der Harn in das im gleichen Zimmer befindliche zur Aufnahme des 24stündigen Quantums bestimmte Hauptgefäß gefüllt. Dieses befindet sich zweckmäßigerweise in einer mit Eiswasser gefüllten Schale und enthält zur Konservierung des Harns 10 *ccm* Toluol. Zum Nachspülen der Urinflaschen nach Entleerung in das Hauptgefäß bedient man sich am besten einer genau bestimmten, für alle Versuchstage gleichen Quantität destillierten Wassers. Mit diesem Waschwasser, das ebenfalls auf Eis gehalten wird, werden die gleichen Bestimmungen vorgenommen, wie mit der Hauptquantität des Harns.

Ob die Bestimmung der einzelnen Bestandteile in je 24stündigen Harnmengen gesondert vorzunehmen ist oder mehrere Tagesquanten zu diesem Zwecke vereinigt werden sollen, hängt von den speziellen Aufgaben ab, die zu beantworten sind. Man wird immer zu bedenken haben, daß die Ausrechnung der Bilanz für jeden Tag deswegen nicht immer angebracht ist, weil der Urin nicht regelmäßig vor Beginn eines neuen Versuchstages entleert wird, so daß nur große Differenzen einen Schluß zulassen. Andrerseits möchte ich bei Ermittlung des Ammoniakwertes z. B. unbedingt raten, die Bestimmung in jeder 24stündigen Portion gesondert vorzunehmen, um den Gefahren einer Zersetzung des Harns zu entgehen. Daß gerade diese Forderung nicht immer beachtet wurde, hat der Aufklärung gewisser wichtiger pädiatrischen Stoffwechselfragen hindernd im Wege gestanden.

Die Abgrenzung des Kotes hat sämtlichen Pädiatern, die sich mit Stoffwechselfragen praktisch beschäftigen, die größten Schwierigkeiten gemacht. Dieser Umstand kommt auch in der Kritik diesbezüglicher Methoden seitens *Czerny* und *Keller*[1]) zum Ausdruck, die raten, von jeder Abgrenzung abzusehen, die doch nur bei Entleerung von festem Kot möglich, von breiigen resp. flüssigen Fäzes illusorisch sei. Auch ich habe mich überzeugen können, daß eine Abgrenzung mit Karmin oder fein zerriebener Tierkohle nicht oder höchst unvollkommen gelingt, da die Entleerung der festen Partikelchen eine ganz unregelmäßige ist. Außerdem haftet dem Karmin, wenn es in größeren Dosen verabfolgt wird, der Nachteil an, Durchfälle zu verursachen. Trotzdem möchte ich im Interesse der Exaktheit auf den Versuch der Abgrenzung nicht verzichten, rate jedoch, denselben mit geringen Mengen von Eichelkakao resp. Heidelbeersaft vorzunehmen. Man kommt da doch häufiger zum Ziele, als man nach den Ausführungen *Czerny-Kellers* anzunehmen geneigt wäre.

Die Analysen von Harn und Kot, — letzterer ist sorgfältig vom Guttaperchapapier in eine Porzellanschale herunterzukratzen resp. mit destilliertem Wasser abzuspritzen (die Wägung des Guttaperchapapieres vor und nach dieser Prozedur und Trocknung gibt das Gewicht des feuchten Kotes) — werden nach den bekannten Methoden vollzogen. Nur sei darauf hingewiesen, daß es sich, der Eigentümlichkeit der Nahrung entsprechend, häufig um stark fetthaltige Fäzes handelt, deren Trocknung Schwierigkeiten macht. Diese gelingt jedoch meist, wenn den Fäzes während des Trocknens auf dem Wasserbade Alkohol oder nach der Vorschrift von *Gregor*[2]) Milchzucker zugefügt wird.

Das Ziel eines jeden Stoffwechselversuches ist die Ermittlung der Bilanz zwischen Einnahmen und Ausgaben. Es genügt daher nicht die quantitative Analyse von Harn und Kot, sondern diese wird erst verwertbar durch die genaue Kenntnis der Zufuhr. Es kann nicht scharf genug dagegen Verwahrung ein-

[1]) *Czerny* und *Keller*, Des Kindes Ernährung, Ernährungsstörungen und Ernährungstherapie. Ein Handbuch f. Ärzte etc. S. 104.

[2]) Siehe bei *Czerny* und *Keller*, l. c.

gelegt werden, sich mit den in den Hand- und Lehrbüchern gebräuchlichen Durchschnittszahlen für die Analysen der Nahrungsmittel zu begnügen und diese bei der Ausrechnung des Stoffwechselversuches zu interpolieren. Speziell für das uns interessierende, leider noch ziemlich jungfräuliche Problem ist zu fordern, daß die Analysen der Einfuhr mit derselben Exaktheit vorgenommen werden wie die der Ausgaben; nur so werden wir allmählich zu konkreten Vorstellungen über den Stoffwechsel des Säuglings bei verschiedenartigen Ernährungsbedingungen und Zuständen kommen.

Die Schwierigkeiten, denen wir durch die Materie an und für sich begegnen, sind ohnehin groß genug. Das lehrt uns am besten das Studium des Stoffwechsels bei natürlicher Ernährung. Physiologisch sind die Verhältnisse bei dieser Art der Ernährung nur dann, wenn die eigene Mutter das Kind stillt. Indem wir das Kind mit vorgelegtem Rezipienten resp. Erlenmeyerkölbchen und Beibehaltung der Guttaperchaunterlage, um jeglichen Verlust von Harn und Kot während des Trinkaktes zu vermeiden, vor und nach diesem wägen, werden wir uns über die Quantität der aufgenommenen Nahrung allerdings orientieren können. Es erübrigt dann aber noch die quantitative Bestimmung der einzelnen Milchbestandteile (Stickstoff, Fett, Zucker, Salze), die in der getrunkenen Milchmenge auszuführen ein Ding der Unmöglichkeit ist.

Es besteht also die Notwendigkeit, sich durch Analyse anderer Milchproben eine Vorstellung über die chemische Zusammensetzung der getrunkenen Milch zu bilden. Darin liegt die große Schwierigkeit, die sich einem exakten Stoffwechselversuch bei natürlicher Ernährung entgegenstellt. Denn die Sekretionsphysiologie der Brustdrüse lehrt, daß die einzelnen Trinkportionen schon während eines Trinkaktes chemisch voneinander differieren können — für das Fett ist diese Tatsache wenigstens mit Sicherheit erwiesen —, so daß aus der Analyse einer beliebig entnommenen Probe nicht auf die Zusammensetzung der ganzen Mahlzeit geschlossen werden darf. Zur Vermeidung größerer Fehler haben *Camerer* und *Söldner*[1]) in den 12 Tagesstunden die gesamte Milch gesammelt, welche sie durch Saugen und Streichen erhalten konnten, und sie zur Analyse benutzt; *Schlossmann*[2]) nimmt die Milchgewinnung in der Weise vor, daß er einige Stunden nach dem Trinken des Säuglings aus der einen Brust die andere möglichst vollständig entleeren läßt. *Gregor*[3]) wiederum versuchte, sich die zur Analyse erforderliche Milchmenge dadurch zu verschaffen, daß er möglichst viele Stichproben während der Mahlzeiten des Säuglings abzog.

---

[1]) *Camerer* und *Söldner*, Analysen der Frauenmilch, Kuhmilch und Stutenmilch. Zeitschr. f. Biol. Bd. **33** (1896).

[2]) *Schlossmann*, Zur Frage der natürlichen Säuglingsernährung. Arch. f. Kinderheilkunde. Bd. **30** (1900). — Derselbe, Weiteres zur Frage der natürlichen Säuglingsernährung. Arch. f. Kinderheilk. Bd. **33** (1902).

[3]) *Gregor*, Der Fettgehalt der Frauenmilch und die Bedeutung der physiologischen Schwankungen desselben in bezug auf das Gedeihen des Kindes. Sammlung klin. Vortr. N. F. Nr. 302.

*Reyher*[1]) macht all den genannten Methoden den Vorwurf, daß sie nicht dem physiologischen Verhalten der Brustdrüsensekretion Rechnung tragen und daher auch nicht zu Rückschlüssen auf die Zusammensetzung der getrunkenen Milchmenge berechtigen.

Als einwandfreie Methode der Milchgewinnung bezeichnet er folgende.

Man entnimmt durch Saugen innerhalb 24 Stunden vor und nach jedem Anlegen des Kindes genau die gleiche Menge Milch und gießt die Einzelportionen zu einer Mischmilch zusammen, die analysiert wird. Um diese Methodik der Milchgewinnung bequem ausführen zu können, hat *Reyher* eine Milchpumpe anfertigen lassen, die es ermöglicht, von vornherein gleich das genau festgesetzte Quantum abzusaugen. Folgende Skizze veranschaulicht diese Milchpumpe (Fig. 280).

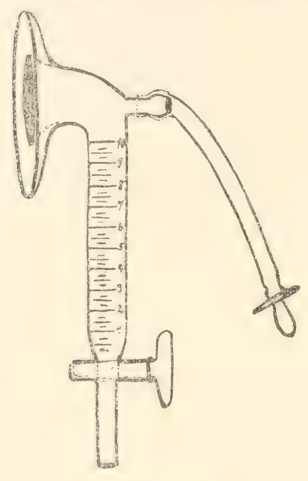


Fig. 280.

Es kann nicht geleugnet werden, daß die von *Reyher* empfohlene Art, die Milch zu entnehmen, mit großen Mühen verknüpft ist, da man gezwungen ist, bei jeder einzelnen Mahlzeit des Kindes selbst anwesend zu sein, um die genau gleichen Mengen durch die Saugpumpe zu gewinnen oder diese Prozedur durch eine absolut zuverlässige Person ausführen zu lassen. Die Anwendung dieser Methodik führt allerdings zu richtigen Vorstellungen über die Quantität des zugeführten Fettes. Die exakte Beweisführung, daß bezüglich der übrigen Frauenmilchbestandteile das gleiche Verhalten vorliegt, steht noch aus.

Man wird die geschilderten Schwierigkeiten umgehen können, wenn man den Stoffwechselversuch bei natürlicher Ernährung nicht in der geschilderten Weise vornimmt, sondern das Kind mit abgezogener Frauenmilch aus der Flasche ernährt. So kann man eine Mischmilch für den ganzen Tag herstellen, von der die Analyse eines Teiles zu absolut sicheren Werten führt. Nur wird man zu bedenken haben, daß dieser Ernährungsmodus nicht dem physiologischen entspricht. Je nach den Zielen, die man im speziellen Falle durch den Stoffwechselversuch anstrebt, wird man das eine oder das andere Verfahren wählen — jenes, dessen Fehler für den gedachten Zweck weniger in Betracht kommen.

Bei den Stoffwechselversuchen mit künstlicher Nahrung fällt die Unsicherheit bezüglich der Analysenwerte weg. Die Milchmischung wird ja

---

[1]) *Reyher*, Über den Fettgehalt der Frauenmilch. Jahrb. f. Kinderheilk. N. F. Bd. **61**. H. 4. S. 601 (1905).

für je 24 Stunden im voraus bereitet und eine Probe für die Analyse steht ohne weiteres zur Verfügung.[1]) Gleichviel, ob der Stoffwechsel bei natürlicher oder künstlicher Ernährung untersucht wird, als Regel muß gelten, jene Nahrung, deren Einfluß auf den Stoffwechsel untersucht werden soll, schon längere Zeit vorher unter den gleichen äußeren Bedingungen zu geben, damit bei Beginn des Versuches die Schwankungen ausgeglichen sind.

Während chemische Analysen der eingeführten Nahrung und von Harn und Kot in größerer Anzahl vorliegen, steht die Untersuchung des Gesamtstoffwechsels im Säuglingsalter (Kohlensäure, Wasser, Sauerstoff) erst im Beginn. Abgesehen von primitiven Versuchen mit der Gummimaske zur Ermittlung des Lungengaswechsels[2]) Neugeborener, sind in erster Linie die klassischen Versuche von *Rubner* und *Heubner*[3]) zu nennen, die sich eines nach dem *Pettenkofer*schen Prinzip gebauten Kastens bedienten.

Der Versuchskasten, in dem sich der Säugling befand, war 75 *cm* lang, 50 *cm* hoch und 50 *cm* breit, aus Weißblech hergestellt und oben mit einem Glasdeckel versehen. Der Säugling lag in einer Höhe von 20 *cm* über dem Boden des Kastens auf einem weitmaschigen Drahtnetz, wie gewöhnlich eingewickelt. Der nutzbare Luftraum des Kastens betrug nach Abzug des

---

[1]) In Berlin kommt die Viktoriaparkmolkerei soweit entgegen, daß sie ein großes Milchquantum durchmischt, abkühlt und nach einem besonderen Verfahren pasteurisiert: die Milch ist auf Wochen hinaus haltbar und genießbar. Man hat von ihrer Anwendung den großen Vorteil, daß man mit einer Qualität für die ganze Versuchsdauer auskommt, was nicht nur von den unvermeidlichen Schwankungen der Milchzusammensetzung unabhängig macht, sondern auch viel Arbeit erspart, da man nur eine Analyse für den ganzen Versuch benötigt.

[2]) Literatur siehe *Zuntz*, Gaswechsel junger säugender Tiere im Handbuch der Physiologie von *Hermann*. Bd. **4**. T. 2. S. 129ff. — *Eckerlein*, Zur Kenntnis des Atemmechanismus bei Neugeborenen. Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gynäkolog. Bd. **19**. — *Büchner*, Die Größe des Luftwechsels in den ersten Lebenstagen. Inaug.-Diss. Bonn 1892. — *Dohrn*, Über die Größe des respiratorischen Luftwechsels in den ersten 10 Lebenstagen. Zeitschr f. Geburtsh. u. Gynäkologie. Bd. **32**. H. 1. — *Enrico Mensi*, Il ricambio respiratiorio nels neonato umano. Giornale della R. Accademia di medicina di Torino 1894. — *Poppi*, Il ricambio materiale e il ricambio respiratiorio nell atrofia infantile. Bologna 1901. — *Forster* in *Pettenkofer* und *Ziemssen*, Handb. d. Hygiene. Leipzig 1852. Bd. **1**. Abt. I. S. 76. — *Scherer*, Die Respiration des Neugeborenen und Säuglings. Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. **43**. S. 471 (1896). („Bei der Versuchsanordnung *Scherers* befand sich das Kind in einem ca. 37 *l* fassenden Respirationsraum, dessen Luft durch einen Ventilationsapparat in fortwährender Bewegung war. Der zur Atmung notwendige Sauerstoff wurde aus einer *Elkan*schen Sauerstoffbombe zugeleitet und gemessen, die vom Kinde ausgeatmete Kohlensäure in Kalilauge aufgefangen. Durch Analyse der Luft im Respirationsraum vor und nach dem Versuch erhielt man die Differenz des Sauerstoff- und Kohlensäuregehaltes auch dieses Raumes. Die Werte wurden zu den durch direkte Messung gefundenen hinzugerechnet. Versuchsdauer 2 Stunden", zit. nach *Rubner* und *Heubner*.)

[3]) *Rubner* und *Heubner*, Die natürliche Ernährung eines Säuglings. Zeitschr. f. Biologie Bd. **36**. S. 1 (1898). — Dieselben, Die künstliche Ernährung eines normalen und eines atrophischen Säuglings. Zeitschr. f. Biologie. Bd. **38**. S. 315 (1899). — Dieselben, Zur Kenntnis der natürlichen Ernährung des Säuglings. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therapie. Bd. **1**. H. 1. S. 1.

Volumens für Versuchskind etc. 150 *l*. Der Luftdurchgang war so reguliert, daß ca. 1000 bis 1250 *l* Luft pro Stunde den Kasten durchströmten. *Rubner* und *Heubner* führten Versuche von viertägiger Dauer aus. Sie wurden an einem verhältnismäßig sehr kleinen Kasten vorgenommen. Dabei kam es vor, daß sich die Wände zeitweise reichlich mit Wasser beschlugen. Man konnte auch in ihm nicht ein ganzes Bett mit der vorstehend beschriebenen verbesserten Stoffwechselschwebe unterbringen.

Bei der Aufstellung eines Respirationsstoffwechselapparates im Laboratorium des Kaiserin Auguste Viktoria-Hauses zur Bekämpfung der Säuglingssterblichkeit im Deutschen Reiche wurde daher nach meinen Angaben ein größerer Respirationsraum gewählt, der in den Abmessungen etwa dem

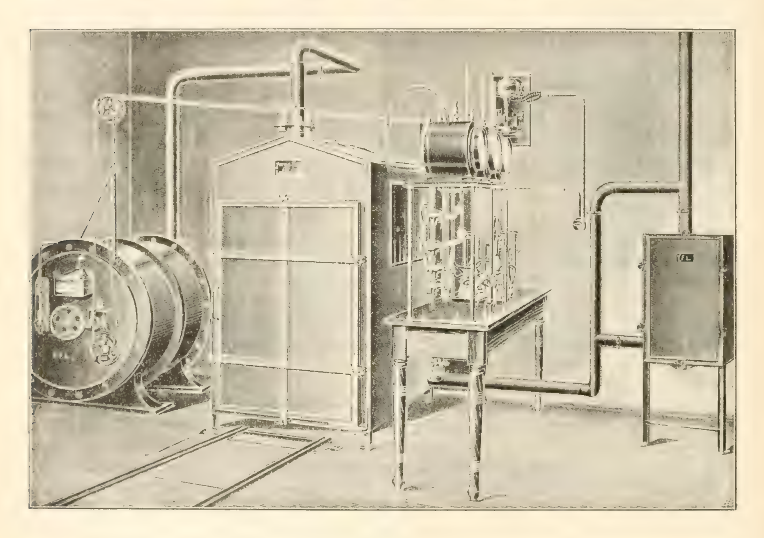


Fig. 281.

Aufstellung des Respirationsapparates im Kaiserin Auguste Viktoria-Hause zur Bekämpfung der Säuglingssterblichkeit im Deutschen Reiche.

jetzt von *Rubner* für den Erwachsenen benutzten Apparat analog ist. Er kann auch für etwas ältere Kinder (bis zu 4 Jahren) benutzt werden.

Die Innenmaße sind die folgenden:

Höhe 1 *m* 49 *cm*
Tiefe 1 *m* 22 *cm*
Breite 1 *m*

Der Luftraum beträgt etwa 1·8 *cm*³. Die allgemeine Einrichtung ist aus der Fig. 281 zu erkennen.

Betreffs des Prinzips sei auf den entsprechenden Abschnitt über den Respirationsstoffwechsel beim Erwachsenen verwiesen.

Vor der Verwendung zu Untersuchungen am Säugling wurden an diesem Apparat von *Bahrdt* und *Edelstein*[1]) die bei jedem neuen Apparat nötigen Dichtigkeits- und Kontrollversuche vorgenommen. Außerdem wurden aber auch noch eine Reihe längerer Versuche angestellt, die den Zweck hatten, die Zulässigkeit der beim Säugling veränderten Versuchsanordnung zu prüfen.

Es wurden im ganzen 21 sogenannte Kerzenversuche angestellt, bei denen die Bedingungen so variiert wurden, daß die Fehlerquellen möglichst rein zum Ausdruck kamen.

Die Brauchbarkeit des Apparates in den oben genannten Abmessungen und in der zum Teil nachträglich verbesserten Ausführung der vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf in Berlin wurde einwandfrei erwiesen.

Die wichtigsten Abweichungen ergeben sich beim Säugling dadurch, daß der Versuch bei jeder Nahrungsaufnahme unterbrochen werden muß, während beim Erwachsenen die Nahrung durch eine Klappe in den Apparat gereicht werden kann. Die Tür muß geöffnet werden, die Luft im Innern gleicht sich mit der Zimmerluft aus.

Das Bett des Säuglings wird herausgefahren. Die in der Abbildung sichtbaren Schienen haben sich dabei bewährt. Das Unterlassen des Herausfahrens empfiehlt sich nicht; das Füttern im Kasten ist schwierig und würde Fehler durch die Respiration des Erwachsenen bedingen.

Die Kerzenversuche sind sehr geeignet zur Prüfung des Apparates. Die Kohlensäure und die Wasserproduktion einer Kerze unterscheidet sich nur wenig von der eines Säuglings. Eine Kerze liefert etwa 3mal so viel $CO_2$ und etwa $^{2}/_{3}$ so viel Wasserdampf wie ein Säugling. Man verwendet am besten die Normalkerzen vom Verband Deutscher Kerzenfabrikanten. Eine einmalige Analyse der Kerze genügt, da die Unterschiede zwischen verschiedenen Kerzen dieser Art nicht in Betracht kommen. Die benutzten Kerzen lieferten 310·6% $CO_2$ und 132% $H_2O$. Der Docht braucht bei der Analyse nicht berücksichtigt zu werden. Eine Kerze brennt etwa 6—7 Stunden.

Es empfiehlt sich auch, wenn die ersten Kerzenversuche stimmen sollten, doch vor Beginn der Untersuchungen eine größere Reihe von Kerzenuntersuchungen anzustellen, da man nach unserer Erfahrung erst dadurch eine genügende Sicherheit erlangt.

Es wurde von *Bahrdt* und *Edelstein* auch ein halbes Dutzend längerer Kerzenversuche von 23—24 Stunden Dauer angestellt. Man braucht dazu nacheinander vier Kerzen, die vorher gewogen und im Kasten aufgestellt wurden. Die Pausen müssen dann so gelegt werden, daß man in einer Pause eine Kerze löscht und eine neue anzündet. Diese längeren Versuche dienten hauptsächlich dem Studium der etwa durch die Pausen bedingten Fehler. Es wurden 5 Pausen zu je 10 Minuten eingeschoben. Der Kasten wurde dabei geöffnet und die Kerze sofort ausgelöscht. Die Tür blieb weit offen.

Während der Pausen ließen wir nach dem Vorgange *Rubners* und *Heubners* den Motor mit den Gasuhren weiterlaufen. Dies bietet den Vorteil, daß das zuweilen vorkommende Stehenbleiben eines Zeigers beim Anlaufen der Uhren sicherer vermieden wird. Bei Beginn des Versuches überzeugt man sich vom Vorwärtsschreiten der Zeiger.

Einen Fehler bedingt das Weiterlaufen nicht, da es hinsichtlich der Analyse der Ausatmungsprodukte nur auf eine Differenz ankommt und während der Pausen im Einstrom und in der Kastenöffnung des Ausstroms die gleiche Luft war.

Besondere Versuche zeigten, daß allerdings ein Fehler eintreten kann, wenn die Zimmerluft sich wesentlich von der Außenluft, die dem Apparat durch eine Rohrleitung zugeführt wird, unterscheidet. Dies kann sich besonders dann ereignen, wenn die verbrauchte Luft, die durch die große Gasuhr mit Wasser gesättigt wird, nicht aus dem Zimmer herausgeleitet wird, wie dies bei unseren ersten Versuchen der Fall war. Das Herausleiten der verbrauchten Luft ist auch notwendig, weil diese beim Passieren der großen Gasuhr, in der sich stagnierendes Wasser befindet, einen unangenehmen,

[1]) *Bahrdt* und *Edelstein*, Zeitschr. f. Biol. 1910 (noch nicht im Druck erschienen).

stickigen Geruch annimmt. Wenn man die Abluft in einen Ventilationsschacht leitet, beachte man, ob dieser gut zieht, da sonst die Luft in das Zimmer zurücksinkt (das Abluftrohr ist auf der Abbildung nicht zu sehen).

Aus denselben Gründen empfiehlt es sich, den Apparat, in dem die Zuluft vorgewärmt (bzw. angefeuchtet) werden soll (rechts in der Abbildung), nicht mit einer offenen Gasheizung zu versehen, sondern entweder elektrisch zu heizen (mit einer kleinen Heizplatte, die man etwa 25 *cm* unterhalb des Ofens aufstellt) oder doch die Heizgase abzuleiten. Eine Vorwärmung ist bei gewöhnlichen Versuchsbedingungen nur zuweilen im Winter nötig, die Einstellung ziemlich leicht.

Die Fehler, die durch die Pausen entstehen, sind am geringsten, wenn man den Respirationsraum überhaupt mit Zimmerluft ventiliert, da dann natürlich die Luft des Einstroms und die während der Pausen eintretende Luft gleich sind. Man öffnet dazu einfach die Vorderwand des Vorwärmers und stellt die Außenluft ab. Dies wird man namentlich im Sommer tun, wenn die Lüftung des Zimmers keine Schwierigkeiten macht. Wenn das Zimmer sich gut lüften läßt, ohne daß die Zimmertemperatur sich ändert, wird man auch im Winter mit Zimmerluft arbeiten können. Die Regulation der Zimmertemperatur ist wichtig, da von ihr die Temperatur im Kasteninnern mindestens ebenso abhängt wie von der Einstromtemperatur und weil bei stärkeren Unterschieden zwischen Zimmer- und Kastenluft Wasserkondensation zu befürchten ist. Eine so starke Kondensation wie bei den kleinen Kasten, mit dem *Rubner* und *Heubner* arbeiteten, wurde übrigens von uns niemals beobachtet.

Zu erwägen ist eine getrennte Aufstellung des Respirationskastens und der übrigen Teile in zwei verschiedenen Räumen; da die Tür zwischen beiden dann aber doch sehr viel benutzt werden würde, werden auch die eventuellen Vorteile (Verbesserung der Luft und Regulierung der Zimmertemperatur, Verminderung der Motorgeräusche im Versuchsraum) größtenteils illusorisch werden. Der Vorwärmer sollte jedenfalls im gleichen Zimmer mit dem Respirationskasten stehen. Der Motor könnte eventuell aus dem Zimmer verlegt werden. Bei dem hier verwendeten Motor entstand das Hauptgeräusch durch die vertikale Achse im unteren Achsenlager. Man verwende nur einen für die angewandte (hier vertikale) Aufstellung gebauten Motor mit genügenden Stopfbüchsen für die Ölung und eine Darmsaite ohne Ende für die Übertragung.

Auf der Abbildung sind nur drei kleine Gasuhren zu sehen, zwei für die Teilströme des Ausstroms, eine für den Einstrom. Es zeigte sich später, daß namentlich, wenn man mit stärkerer Ventilation arbeitet, die Analyse des Einstroms doch sehr in Betracht kommt. (Die Differenzen im prozentualen Gehalt von Ein- und Ausstrom sind dann nämlich nicht sehr groß.) Auch bei Benutzung von Zimmerluft ist die genaue Analyse des Einstroms besonders wünschenswert. Es wurde deshalb noch eine vierte Gasuhr mit Teilstrom und Pumpwerk hinzugefügt. Diese gewährt auch eine größere Sicherheit bei etwaigem Defekt oder verunglückter Analyse eines Teilstroms.

Zur Kontrolle und Einstellung der Luft sind mehrere Thermometer nötig, und zwar im Zimmer in der Nähe des Kastens und an ferneren Stellen im Einstrom unmittelbar vor dem Kasten, im Kasten am Fenster, gegenüber der Einstromseite; hier hängt auch ein Hygrometer.

Wünschenswert ist eine elektrische Beleuchtung über dem Dachfenster des Kastens.

Sehr wichtig ist die Kontrolle der kleinen Gasuhren; man beginne nicht mit den Kerzenversuchen, bevor man sich nicht von der absoluten und dauernden Dichtigkeit jeder einzelnen Gasuhr und jedes Teilstroms überzeugt hat. Man prüft die Dichtigkeit, indem man ein Wassermanometer an die Ausstromöffnung anschließt und Luft eintreibt, bis das Manometer auf 10 *cm* steigt. Dann muß es auf dieser Höhe genau stehen bleiben. Unsere Gasuhren waren anfangs sämtlich undicht, und zwar mußten besonders die Verschraubungen an den Einstrommundstücken gedichtet werden. Weitere erhebliche Fehler entstehen dadurch, daß die Gasuhren nicht genug gefüllt sein können oder nicht

genau nivelliert sind. Man muß die Uhren stets zuerst nivellieren und dann erst nachfüllen. Die Uhren sind erst dann genügend gefüllt, wenn das oben zugegossene Wasser unten reichlich und in gleicher Quantität wieder ausströmt. Hat man versehentlich die Uhren etwas verschoben, so muß man nochmals nivellieren und nachfüllen. Das Fundament für die Gasuhren muß stabil sein, die Holzplatte darf nicht naß werden, damit sie sich nicht zieht.

Auch die große Gasuhr muß von Zeit zu Zeit nachgefüllt werden.

Undichtigkeiten an anderen Stellen kommen seltener vor. Man kontrolliere von Zeit zu Zeit jeden Teilstrom einzeln, nötigenfalls Gasuhr, Pumpwerk und Rohrleitung getrennt, auf Dichtigkeit.

Den Kasten prüft man vorsichtig dadurch, daß man den Haupteinstrom von innen abdichtet und an einen Teilstrom ein Manometer anschließt, dann mit der großen Gasuhr Luft aussaugt. Diese Prüfung ist wohl nur einmal nötig.

Sehr wichtig ist, daß man überall allerbesten, frischen Gummischlauch vom richtigen Kaliber verwendet.

Die Eichung der Gasuhren ist wohl stets genügend genau, wenn diese dicht, richtig nivelliert und richtig gefüllt sind. Man überzeugt sich davon, indem man alle Uhren mit Gummischläuchen hintereinander verbindet und eine gemessene Luftmenge (10 *l*) durchschickt. Letztere bestimmt man in bekannter Weise durch Wägung des Wassers, mit dem man die Luft aus einer großen Flasche verdrängt.

Vor jedem Tagesversuch empfiehlt sich ein Nachfüllen und Prüfen auf richtigen Gang in folgender Weise: 1. Nivellieren, 2. Nachfüllen, 3. nochmalige Kontrolle der Libelle, 4. Hintereinanderschalten aller Gasuhren und Anschluß an eine der Pumpen, 5. Laufenlassen des Motors für 5—10 Minuten, damit sich die Gasuhren gleichmäßig benetzen; dabei Kontrolle, ob alle Zeiger vorwärtsschreiten, 6. nochmals 10 Minuten laufen lassen unter Ablesen. Die abgelesenen Zahlen müssen dann bis auf 1% übereinstimmen.

Das richtige Ablesen der Gasuhren erfordert einige Übung. Es sollten prinzipiell stets mehrere Personen unabhängig voneinander die Ablesungen vornehmen.

Die Ventile des Pumpwerks sind so einzustellen, daß möglichst viel Luft durch die Teilströme geht, die Ventilation der einzelnen Teilströme kann ohne Schaden erheblich differieren.

Am besprochenen Apparat waren die gläsernen Pumpenkolben kleiner, als sie es an Apparaten für Erwachsene gewöhnlich sind. Nötig ist das nicht. Die Maße waren 15 *cm* Länge und 1·5 *cm* Durchmesser. Wenn man größere Durchmesser nimmt, hat man ein etwas günstigeres Verhältnis zwischen Haupt- und Teilstrom. Man muß dann aber auch mehr Barytlauge vorlegen und andere Pipetten und Standzylinder bei der Titration wählen.

Bei der Einstellung der Hubhöhe der Pumpenzylinder muß darauf geachtet werden, daß beim Anheben das Quecksilber nicht in die inneren Glasröhren gesaugt wird, aber gleichwohl die Hubhöhe eine möglichst große ist.

Darmsaiten, Glasteile und Quecksilber müssen jederzeit für vorkommende Defekte in Reserve gehalten werden.

Am Pumpwerk ändere man möglichst wenig, nachdem es einmal in Ordnung gebracht ist.

Die Absorptionsapparate müssen in doppelter Zahl vorhanden sein, wenn man Tagesversuche möglichst aneinander anschließen will.

Die Bestimmung der Kohlensäure geschah nach der schon von *Pettenkofer*[1]) empfohlenen Methode, und zwar durch Titration der überschüssigen Barytlauge mit $^1/_{10}$ n-

[1]) Abhandl. d. kgl. bayerischen Akad. d. Wissensch. II. Kl. Bd. 9. Abt. 2. Annalen d. Chem. u. Pharm. Bd. 2. Suppl. S. 1.

Oxalsäure und Phenolphtalein als Indikator. Die Barytlauge wird durch Lösen von je 20 *g* käuflichem Baryumhydroxyd und 0·9 *g* Baryumchlorid pro Liter hergestellt.[1] Dann läßt man sie 3 Tage stehen und hebert die Flüssigkeit in eine kohlensäurefreie, trockene Flasche hinein. Am besten stellt man sich 10 *l* auf einmal her.

Für 24stündige Versuche reichten 180 $cm^3$ Barytlauge (zweimal 90 für jeden Teilstrom) vollkommen aus. Meistens war in der zweiten (Kontroll-)Röhre nur ganz wenig Kohlensäure absorbiert. Die Pettenkoferröhren wurden gleich nach Beendigung des Versuches in hohe, gerade, etwas über 90 $cm^3$ fassende Zylinder entleert, die letzteren gut zugestopselt. Nach kurzer Zeit[2]) setzte sich das ausgefallene Baryumkarbonat zu Boden.

Es ist wünschenswert, daß man von dem Inhalt der Pettenkoferröhren einen möglichst großen Teil titriert, da dann die Fehler sich weniger durch die Rechnung vergrößern.

Es wurden 70 $cm^3$ herauspipettiert, titriert, die Anzahl der gebrauchten Kubikzentimeter auf 90 $cm^3$ umgerechnet und von dem bei jedem Versuch aufs neue festgestellten Titer abgezogen. Diese Zahl, mit 0·0022 multipliziert $\left(\frac{CO_2}{2} = 22\right)$, ergibt die Menge der Kohlensäure.

Die Titration nimmt man zweckmäßig im selben Raum vor. Wasser wurde durch Auffangen in mit Bimsstein und konz. $H_2SO_4$ gefüllten Kölbchen und Wägen bestimmt. Es ist nötig, die Kölbchen sofort zu wägen und darauf zu achten, daß die durch Schliffe befestigten Ein- und Ausleitungsröhrchen sich nicht lockern.

Die Geschwindigkeit der Ventilation läßt sich variieren. Wir benutzten an unserem Motor für das Pumpwerk der Teilströme stets die größte Geschwindigkeit. Die Übersetzung für die große Gasuhr war am Motor ebenfalls die größte. In zahlreichen Versuchen wurde die Gesamtventilation durch Auswechseln der Zahnräder an der großen Gasuhr verändert.

Die stündliche Ventilation des Kastens war dann

| | | | |
|---|---|---|---|
| bei kleinster | Übersetzung | etwa | 6 $m^3$ pro Stunde |
| „ mittlerer | „ | „ | 12 „ „ „ |
| „ größter | „ | „ | 24 „ „ „ |

Auch bei größter Ventilation war keine eigentliche Zugluft zu bemerken. Allerdings zeigte ein zeitweiliges Flackern der Kerze eine verstärkte Luftströmung an, die Verbrennung des Kerzenmaterials zu $CO_2$ wurde aber dadurch nicht merklich beeinträchtigt (bei mittlerer und kleinster Geschwindigkeit flackerte die Kerze nicht). Jedenfalls war das Flackern nicht stärker. als dies gewöhnlich im Zimmer zu beobachten ist. Die Ventilation von 24 $cm^3$ pro Stunde dürfte somit auf den Säugling nicht störend wirken.

Die Kerzenversuche zeigten, daß bei allen drei Ventilationsstärken sowohl 24stündige Versuche, mit 5 Pausen von je 10 Minuten, als auch kürzere von 4—6 Stunden, eine genügende Bestimmung der $CO_2$ ermöglichen.

Wir betrachten Resultate mit Fehlern unter $2^0/_0$ auf $CO_2$, nicht auf C berechnet, (meistens ein Defizit) als genügend.

Die Bestimmung der Wasserproduktion durch Haut und Lunge ist mit größeren Schwierigkeiten verbunden. Fehler können entstehen durch Kondensation von Wasser an den Wänden des abgekühlten Kastens, wahrscheinlich besonders am Boden desselben. Deshalb ist eine möglichst genaue Regulierung der Zimmertemperatur wichtig.

Das vom Säugling an die Wäsche abgegebene Wasser wird bestimmt durch Wägen auf einer auf Zehntelgramme genauen Wage. Die Wäsche ist vor dem Versuch, am besten in einem warmen Luftstrom, zu trocknen. Die großen Kissen, auf die man den

[1]) Zentralbl. f. innere Med. Bd. **1**. S. 353 (1897); *Traedwell*, Lehrb. d. analyt. Chemie. Bd. **2**. S. 433 (1907).

[2]) Die mit Barythydrat und Baryumkarbonat gefüllten Zylinder kann man übrigens ohne Gefahr eines Fehlers einige Stunden stehen lassen.

Säugling zu legen pflegt, können ganz entbehrt werden. Die von der Luft an die Wäsche abgegebene Feuchtigkeit beträgt gewöhnlich nur wenige Gramm in 24 Stunden. Viel mehr Wasser wird vom Säugling durch die Haut an die Wäsche abgegeben.[1])

Die Fehler bei der Wasserbestimmung betragen 4—10⁰/₀, meistens 8—10⁰/₀, in der Regel wird ein Plus erhalten.

Demnach muß man annehmen, daß bei der während des Versuchs erfolgenden Erwärmung die Wände des Kastens trocken werden.

In einem besonderen Versuch untersuchten wir, welche Fehler durch Wasserverluste aus der Wäsche und durch die Pausen entstehen können. Der Versuch wurde so angestellt, daß ein eben aus kochendem Wasser herausgenommener, gut abgetrockneter Thermophor wie ein Säugling auf der Stoffwechselschwebe aufgespannt und mit 100 *g* Wasser benetzt wurde; das Wasser wird von der den Thermophor umgebenden Watte vollkommen aufgesaugt.

Der Versuch dauerte 24 Stunden, 4 Kerzen wurden nacheinander verbrannt, 5 Pausen zu je 10 Minuten gemacht.

Die Wägung ergab, daß etwa ein Drittel des Wassers verdunstet war (vgl. Protokoll). Der Versuch zeigt, daß der Wasserfehler sich dabei nicht verändert (+ 10⁰/₀).

Für die Wahl der Ventilationsstärke kommen außer der Analysengenauigkeit natürlich noch die hygienischen Versuchsbedingungen für den Säugling in Frage. Daß die Ventilation von 24 und 12 $m^3$ pro Stunde bei einem Kastenvolumen von 1·8 $m^3$ genügt, ist selbstverständlich. Die Ventilation von 6 $m^3$ bedeutet eine 3—4malige Erneuerung der Luft pro Stunde, entspricht also den Verhältnissen in einem normalen Wohnraum durchaus. Übrigens ist auch der Luftkubus, 1·8 $m^2$ für den Säugling, nur ein wenig geringer als man ihn in einem Wohnraum verlangt (etwa $^1/_3$ des Ventilationsquantums).

Man wird daher die Geschwindigkeit der Ventilation wählen, bei der die Analysen am besten stimmen. Die Kohlensäure stimmte bei den Kerzenversuchen bei allen drei Geschwindigkeiten gut.

Das Verhältnis des Wassers im Ein- zu dem im Ausstrom ist viel ungünstiger als das der Kohlensäure. Die $H_2O$-Bestimmungen der einzelnen Teilströme stimmten zwar bei unseren Versuchen bei allen 3 Geschwindigkeiten untereinander gut überein, dagegen zeigten sich etwas größere Fehler beim Vergleich des aus der Kerze berechneten $H_2O$ mit dem im Versuch erhaltenen (4—10⁰/₀, siehe oben), und diese Fehlergröße war, wie es scheint, abhängig von der Ventilation.

Unter den besonderen Bedingungen stimmten die Wassermengen am besten bei der langsamen Ventilation, am schlechtesten bei der größten Geschwindigkeit. Das dürfte daher kommen, daß bei den Versuchen im Winter relativ trockene Außenluft ohne Anfeuchtung erwärmt in den Kasten gelangte und dessen Wände austrocknete. Dieser Fehler mußte naturgemäß bei starker Ventilation am größten ausfallen. Der Fehler wird sich wahrscheinlich durch Vorventilieren des Kastens, Benutzung von gut gelüfteter Zimmerluft und besonders guten Ausgleich der Zimmer- und Kastentemperatur noch wesentlich verringern lassen. Übrigens erlauben auch Fehler von 4—10⁰/₀, bei der nötigen Kritik, die Untersuchung des Wasserstoffwechsels.

Zum Schluß sei noch das Protokoll eines Kerzenversuchs angeführt, aus dem man einen Einblick in die vorkommenden Zahlen und die Berechnung gewinnt.

Bei diesem Versuche wurde die Verdunstung gewogener Wassermengen aus der Wäsche und Stoffwechselschwebe, in der sich ein Thermophor befand, untersucht.

**Kerzenversuch XXI.** 21. XII. 09 bis 22. XII. 09. Mittlere Geschwindigkeit (Ventilation ca. 12 $m^3$ pro Stunde), vorgewärmte Außenluft, nicht angefeuchtet. Temperatur 19·6—21·6⁰. In der Stoffwechselschwebe getrocknete Wäsche mit Thermophor und 100 *g* Wasser. Es verbrannten 4 Kerzen.

Versuchszeit 6 Uhr abends bis 6 Uhr abends. 24 Stunden.

---

[1]) Anm. b. d. Korrektur: Durch Vereinfachung der Stoffwechselschwebe gelang es, die Gewichtsveränderung durch das vom Säugling ausgeschiedene Wasser ebenfalls auf wenige Gramm zu verringern. *Bahrdt* und *Edelstein,* Zeitschr. f. Biol. 1910 (noch nicht erschienen).

5 Pausen zu 10 Minuten, Motor läuft dabei weiter.

| Kerzen: | Vorher | Nachher |
|---|---|---|
| I. Kerze + Schale | 86·5378 | 42·2098 |
| II. | 87·3000 | 43·3721 |
| III. | 96·9174 | 53·4080 |
| IV. | 90·7342 | 44·6812 |
| | 361·4894 | 183·6711 |
| | 183·6711 | |
| | 177·8183 verbrannte Kerze | |

(177·8183 × 310·6) = 552·30 *g* berechnete $CO_2$
(177·8183 × 132) = 234·72 *g* berechnetes $H_2O$
dazu 100·00 *g* in der Wäsche
= 334·72 *g* $H_2O$.

| | | Größe | Einstrom *a)* | Einstrom *b)* | Ausstrom *a)* | Ausstrom *b)* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gasuhren | nachher | 02602·7 | 0·79224 | 0·31635 | 0·75342 | 0·88237 |
| | vorher | 02312·0 | 0·76410 | 0·26722 | 0·69429 | 0·79892 |
| | $m^3$ | 290·7 | 0·02805 | 0·04913 | 0·05913 | 0·08345 |

**$CO_2$-Bestimmung.**

Titration:

Titer der Lauge: 90 $cm^3$ = 107·2 $^1/_{10}$ n-Oxalsäure (vorher)
107·0 (nachher)
in Mittel = 107·1

Einstrom *a)* 70 Lauge = 76·8 Oxalsäure
90 = 98·68

107·1
— 98·68
9·42 in Röhre I.

70 Lauge = 83·2 Oxalsäure
90 = 106·91

107·1
— 106·91
0·19 in Röhre II.

8·42
+ 0·19
8·61 in Röhre I u. II.

8·61 × 0·0022 = 0·018942 *g* $CO_2$

Einstrom *b)* 70 = 71·7
90 = 92·3
14·97

70 = 83·2
90 = 106·91
0·19

15·16 × 0·0022 = 0·033352 *g* $CO_2$

Ausstrom *a)* 70 = 30·6
90 = 39·32 67·78

70 = 82·95
90 = 106·59
0·51

68·29 × 0·0022 = 0·150238 *g* $CO_2$

Ausstrom *b)* 70 = 11·3
90 = 14·52
92·58

70 = 80·6
90 = 103·57
3·53

96·11 × 0·0022 = 0·211442 *g* $CO_2$

Berechnung pro Kubikmeter:

Einstrom *a)* (0·018942 : 0·02805) = 0·675 *g* $CO_2$ pro Kubikmeter
*b)* (0·033352 : 0·04913) = 0·678 *g* $CO_2$
Ausstrom *a)* (0·150238 : 0·05913) = 2·53 *g* $CO_2$
*b)* (0·211442 : 0·08345) = 2·53 *g* $CO_2$

**Wasserbestimmung.**

Wägung:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Einstrom *a)* | 1. Kölbchen | 0·0921 | *b)* | 0·1623 |
| | 2. „ | 0·0039 | | 0·0047 |
| | | 0·0960 *g* $H_2O$ | | 0·1670 *g* $H_2O$ |
| Ausstrom *a)* | | 0·2535 | *b)* | 0·3589 |
| | | 0·0096 | | 0·0032 |
| | | 0·2631 *g* $H_2O$ | | 0·3621 *g* $H_2O$ |

Berechnung pro Kubikmeter:

Einstrom *a)* (0·0960 : 0·02805) = 3·42 *g* $H_2O$ pro Kubikmeter
*b)* (0·1670 : 0·04913) = 3·399 *g* $H_2O$
Ausstrom *a)* (0·2631 : 0·05913) = 4·45 *g* $H_2O$
*b)* (0·3621 : 0·08345) = 4·43 *g* $H_2O$.

Wasser in der Kleidung:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Stoffwechselschwebe nachher | 320·3 | (Wäsche + 100 Wasser) nachher | 290·4 |
| vorher | 324·75 | vorher | 321·83 |
| — | 4·45 | — | 31·43 |

Wasserverlust der Kleidung: 35·88 *g*

| | | |
|---|---|---|
| Wasserrest in der Kleidung (berechnet) | 321·83 | 290·4 |
| | + 324·75 | 320·3 |
| | 646·58 | 610·7 |
| | — 100·00 | — 546·58 |
| | 546·58 | 64·12 |

**Gesamtventilation.**

| | | |
|---|---|---|
| | 290·7 | durch große Gasuhr |
| | 0·05913 | durch die Teilströme |
| | 0·08345 | |
| (6 × 1·8) = | 10·8 | für 5 Pausen und 1 Anfangsvolumen |
| | 301·64258 $m^3$ | |

**Gesamtproduktion.**

$CO_2$

(301·64258 × 2·53) = 763·155
(301·64258 × 0·676) = 203·910
559·245 *g* $CO_2$

$H_2O$

(301·64258 × 4·44) = 1339·29
(301·64258 × 3·415) = 1030·05
309·24 *g* $H_2O$
\+ 64·12 *g* in der Kleidung
373·36 *g* $H_2O$

**Bilanz.**

| $CO_2$ | | $H_2O$ | |
|---|---|---|---|
| berechnet | 552·30 | berechnet | 334·72 |
| gefunden | 559·245 | gefunden | 373·36 |
| Fehler + | 6·945 (1·2 [illegible]) | Fehler − | 38·64 (10 [illegible]) |

*Schlossmann*[1]) hat mit einem auf den Ideen von *Regnault* und *Reiset* basierenden, von *Zuntz* und *Oppenheimer* verbesserten Apparat, den die Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf herstellen (Fig. 282), Messungen über Sauerstoffverbrauch und Kohlensäureausscheidung im Säuglingsalter vorgenommen.

Da nur die Düsseldorfer Kinderklinik einen solchen Apparat besitzt und lediglich *Schlossmann* Erfahrungen über die Bedienung und die Leistungsfähigkeit hat, gebe ich die Angaben darüber mit *Schlossmanns* eigenen Worten wieder:

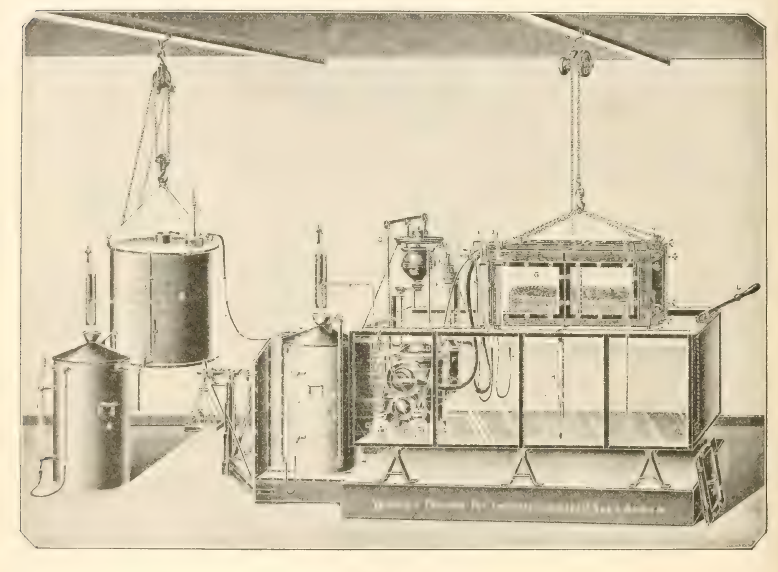


Fig. 282.

Der inzwischen seit Monaten fertiggestellte und in Betrieb genommene Apparat besteht aus einem großen 2 *m* langen Wassergefäß, in das die ganze Apparatur hinein-

[1]) *A. Schlossmann* und *Hans Murschhauser*, Über Eichung und Zuverlässigkeit des von *Zuntz* und *Oppenheimer* modifizierten Respirationsapparates nach dem Prinzip von *Regnault* und *Reiset*. Biochem. Zeitschr. Bd. **14**. H. 5 und 6. S. 369 (1908) und Über den Einfluß des Alters und der Größe auf den Gasstoffwechsel des Säuglings. Biochem. Zeitschr. Bd. **18**. H. 6. S. 499 (1909). — *A. Schlossmann*, Zur Frage des respiratorischen Stoffwechsels beim Säugling. Verhandlg. d. Gesellsch. f. Kinderheilk. S. 52 (1908) und Über den Einfluß der Ernährung auf den respiratorischen Stoffwechsel. Verhandl. d. Kongr. f. inn. Med. S. 290 (1909). — *H. Murschhauser*, Eine neue Bürette zur Analyse hochprozentigen Sauerstoffs. Zeitschr. f. angewandte Chemie und Zentralbl. f. techn. Chemie. Bd. **21**. H. 49. S. 2503 (1908).

gebaut ist, und in dem der kleinere, 1 *m* lange, 39 *cm* breite und 43 *cm* hohe eigentliche Versuchskasten, nachdem das Kind hineingelegt worden ist, hereingelassen wird. Das Kind ist also bei den Versuchen unter Wasser, ebenso wie die Absorption der $CO_2$ in einem unter Wasser befindlichen Gefäß statthat und ebenso wie auch die Schlauchverbindungen zwischen Absorptionsgefäß und dem Aufenthaltskasten des Kindes unter Wasser liegen.

Der Vorteil, den diese Anordnung gewährt, ist ein doppelter. Einmal nämlich würde jede Undichtigkeit des Kastens und der Schlauchverbindungen sich sofort durch aufsteigende Blasen im Wasser deutlich markieren. Wer lange Zeit mit der Dichtung solcher Apparate sich beschäftigt hat und die vielen unangenehmen Überraschungen kennt, welche man auch bei der Verwendung des verschiedenartigsten Materials immer wieder erlebt, der wird die Wichtigkeit der auf diese Weise erhaltenen Sicherung zu schätzen wissen. Zweitens aber wird durch die große Wassermenge, welche den eigentlichen Versuchskasten umgibt, die Temperatur in dem Kasten selbst sehr gleichmäßig gehalten und gerade die Temperaturgleichmäßigkeit spielt ja bei allen Versuchen, bei denen Gase volumetrisch gemessen werden, eine große Rolle.

Die Absorption der gebildeten $CO_2$ erfolgt dadurch, daß ein elektrisch angetriebener kleiner Ventilator in einem völlig luftdichten eisernen Gehäuse eingeschlossen und ebenfalls unter Wasser in den großen Behälter eingebaut ist. Dieser Ventilator saugt die Luft aus dem Kasten an und treibt sie durch das $CO_2$-Absorptionsgefäß hindurch und nachdem sie kohlensäurefrei geworden ist, wieder in den Kasten zurück. Das $CO_2$-Absorptionsgefäß besteht aus einem eisernen Topf, der oben durch einen abschließbaren Deckel verschlossen ist und nach unten durch einen Hahn, der durch den Boden der Wanne geht, entleert werden kann.[1])

Gleichzeitig dient der Motor dazu, das Wasser der Wanne in Zirkulation zu erhalten und dadurch für möglichst gleichmäßige Temperatur desselben zu sorgen. Neben der großen Wanne steht auf einer in den Boden eingelassenen Wage der Gasometer für den O, der, wenn durch $CO_2$-Absorption der Druck in dem Versuchskasten sinkt, immer in entsprechender Menge nachdringt, nachdem er vorher durch ein entsprechendes Reinigungsgefäß geleitet worden ist.

Selbstverständlich mußten, bevor wir daran gingen, den Apparat für Kinder zu benutzen, alle möglichen Vorsichtsmaßregeln ergriffen werden, um die absolute Unschädlichkeit des Aufenthaltes in dem Raume unter Wasser zu erweisen. Die zahlreichen Vorversuche, welche zu diesem Zweck angestellt wurden, dienten gleichzeitig dazu, uns mit dem Gebrauche der komplizierten Apparatur völlig vertraut zu machen.

Die Gefahren, welche man befürchten konnte, waren folgende: erstens war es denkbar, daß gelegentlich durch Stillstehen des Motors die Absorption der $CO_2$ unterblieb, daß also auf diese Weise eine $CO_2$-Anreicherung im Versuchskasten hätte Platz greifen können, welche zu einer Schädigung des Versuchskindes führen müßte. Abgesehen davon, daß man das Stehenbleiben des Motors und das Versagen der Pumpe ja sofort sehen und hören würde, haben wir eine selbsttätige elektrische Klingelleitung angelegt, welche sofort in Tätigkeit tritt, wenn der Motor nicht mehr oder nicht mehr rasch genug arbeitet. Zweitens können wir durch Beobachtung eines im Versuchsraum angebrachten Thermobarometers den Druck im Versuchsraum genau kontrollieren. Dieses Thermobarometer muß fortgesetzt beobachtet werden und gibt ja den besten Hinweis, wenn etwa eine $CO_2$-Stauung im Raum eintreten würde. Drittens ist der Strahl der Lauge im Absorptionsgefäß durch eingebaute kleine Glasscheiben von außen zu übersehen. Man kann sich jederzeit davon überzeugen, daß der Laugenstrahl genügend hoch in die Höhe geht und daß auf diese Weise die nötige $CO_2$-Absorption gewährleistet wird und nicht etwa eine kleine Verstopfung der Düse des Absorptionsapparates ein Hindernis nach dieser Richtung abgibt.

[1]) Genaue Beschreibung siehe *Zuntz* und *Oppenheimer*, Das verbesserte Modell eines Respirationsapparates nach dem Prinzip von *Regnault* und *Reiset*, Biochemische Zeitschrift. 1908.

Der Versuchskasten selber hängt an der Kette eines Flaschenzuges, so daß das In-die-Höhe-ziehen des immerhin schweren Aufenthaltsraumes momentan ermöglicht ist. Ein einziger Hebelgriff gestattete weiter im Boden der Wanne einen Verschluß zu lösen, so daß das Wasser sich in einem starken Strom in eine in dem Unterbau vorgesehene breite Rinne entleert. Es ist also ausgeschlossen, daß etwa durch eintretendes Wasser das Kind geschädigt werden könnte. Zudem ist auf dem Boden des Aufenthaltskastens abermals eine selbsttätig wirkende Vorrichtung angebracht, welche das Eindringen der ersten Tropfen Wasser durch ein Klingelsignal zur Kenntnis bringen würde, noch bereits bevor von außen etwas zu sehen ist.

Wir haben weiter einen ganz regelmäßigen und genauen Beobachtungsdienst für die Versuche eingerichtet. So müssen während der ganzen Versuchszeit ununterbrochen im Versuchsraum anwesend sein: 1. der Leiter des Versuches, 2. ein Arzt, der das Kind zu beobachten hat, sich aber nicht mit Ablesungen usw. beschäftigt, 3. eine besonders tüchtige und aufmerksame Schwester, und zwar immer dieselbe, die vollkommen genau Bescheid weiß, worauf es ankommt und 4. ein Laboratoriumsdiener. Alle am Versuch Beteiligten nahmen ihre Mahlzeiten im Versuchszimmer ein, so daß die Kontrolle nicht einen Augenblick eine verminderte war.

Bevor wir an Versuche mit Kindern herantraten, wurde der Apparat nach zwei Richtungen hin geprüft: einmal nämlich durch Versuche an Tieren, und zwar an hungernden Hunden, um uns von dem tadellosen Funktionieren des ganzen Mechanismus zu überzeugen, gleichzeitig aber nochmals den Nachweis zu bringen, daß der Aufenthalt in dem von der Außenwelt abgeschlossenen Raume mit irgend welchen Nachteilen für das Versuchsobjekt nicht verknüpft ist. Näher auf diese Tierversuche einzugehen, erübrigt sich um so mehr, als *Oppenheimer* sich ja erst vor einiger Zeit ausführlicher nach dieser Richtung hin geäußert hat. [1])

Wichtig war aber für uns die zweite Frage, nämlich erst einmal zu ermitteln, wie groß die zu erwartende Genauigkeit bei den Versuchen ist. Wir bedienten uns zu dieser Austitrierung des Äthylalkohols und die damit erzielten Resultate entsprachen vollständig den gestellten Erwartungen. Es würde zu weit führen, wenn ich hier auf alle diese Einzelheiten eingehen würde. Ich führe nur einen besonders gelungenen Versuch an, bei dem zufällig sowohl der O, der verbraucht wurde, wie die $CO_2$, die gewonnen wurde, mit dem theoretisch berechneten Werte nach jeder Richtung hin sehr gut übereinstimmte. Die Anführung des Protokolls gestattet gleichzeitig einen Einblick in die ganze Methodik des Versuches.

Alkoholversuch vom 9. Mai 1908.

Verbrannt = 97·56 *g* Alkohol (spez. Gew. 0·8510 = 78·92 Gewichtsprozente)
= 76·99 *g* $C_2H_5OH$ Dauer $5^1/_2$ Stunden
Anfangswerte: Temp. 22·0 Bar. corr. 753·85 Man. — 7·20 Thermobar. — 7·10
Endwerte: „ 20·0 „ „ 755·0 „ — 1·13 „ — 6·25
Anfangsvol.: 215·867 *l* bei 22·0° und 753·75 *mm* Hg = 192·946 *l*
Endvol.: 215·967 *l* „ 22·0° „ 758·97 „ „ 194·408 *l*

| Analyse der Anfangsluft | Analyse der Endluft | Analyse des O |
|---|---|---|
| $CO_2$ — 0·10% | 0·55% | $CO_2$ = 0·12% |
| $O_2$ = 20·26% | 18·40% | $O_2$ = 94·84% |
| $N_2$ 79·64% | 81·55% | $N_2$ = 5·04% |
| 100·00% | 100·00% | 100·00% |

Sauerstoffbilanz.

| | |
|---|---|
| Vorher vorhanden: | 39·091 *l* |
| Nachher „ | 35·771 *l* |
| | 3·320 *l* |

[1]) Biochem. Zeitschr. Bd. 4. 1907.

Zugeführt aus Gasometer I 74·75 *kg* bei 18·6° und 108·40 Thermobar. = 68·626 *l*
„ „ „ II 49·71 „ „ 20·1° „ 109·05 „ = 45·666 *l*

114·292 *l*

Davon ab N in $O_2$ = 5·760 *l*
„ „ $CO_2$ „ $O_2$ = 0·137 *l*

108·395 *l*

Dazu aus Anfangsluft 3·320 *l*

Netto-$O_2$-Verbrauch = 111·715 *l*
Berechnet = 112·420 *l*
Fehler = 0·62°/₀

## $CO_2$-Bilanz.

Vorher vorhanden: 0·198 *l*
Nachher „ 0·98 *l*
In die Lauge übergeg.: 0·100 *l* = 0·19 *g*

Aus Lauge = 148·17 *g*
Davon ab aus Anfangsl. = 0·19 *g*

147·98 *g*

Ab durch Verbrennen von Docht = 0·19 *g*

Gesamt-$CO_2$ = 147·79 *g*
Berechnet $CO_2$ = 147·28 *g*
Fehler = 0·34°/₀

## Stickstoffbilanz.

Vorher vorhanden: 153·662 *l*
Nachher „ 158·539 *l*

4·877 *l*

$N_2$ aus $O_2$ (5·04°/₀) = 5·760 *l*
Fehler = 0·88 *l*

Wir sehen also, daß hier in diesem Versuche der Fehler für den berechneten O gegenüber dem verbrauchten 0·62°/₀, bei der $CO_2$ 0·34°/₀ beträgt.

Als Durchschnitt aus einer ganzen Versuchsreihe fanden wir für die $CO_2$ durchschnittlich ein zu viel von 0·42 für den O, einen Fehler von durchschnittlich −2°/₀, wobei allerdings zwei sehr ungünstig ausgefallene Versuche mit inbegriffen sind. Jedenfalls erweisen diese Zahlen, daß wir eine vollkommen hinreichende Genauigkeit mit Hilfe des Apparates erzielen können.“

## b) Stoffwechselversuche an Hunden, an Wiederkäuern und an Vögeln. Gewinnung der sensiblen Ausscheidungen.

Von **W. Völtz**, Berlin.

### I. Stoffwechselversuche an Hunden.

Stoffwechselversuche an Hunden sind im Vergleich zu anderen Tierarten wohl am leichtesten durchführbar.

Da die Aufenthaltsdauer der Contenta im Magendarmkanal der Fleischfresser eine relativ kurze ist, und die Abgrenzung der Fäzes und des Harnes kaum auf erhebliche Schwierigkeiten stößt, können die einzelnen Fütterungsperioden im allgemeinen von erheblich kürzerer Dauer sein als z. B. bei Herbivoren. Ob 5- oder 10tägige Perioden usw. anzustellen sind, hängt natürlich von der Fragestellung ab, ebenso die zu verabreichende Futtermenge. Die Nahrungszufuhr kann zwischen 60 und 140 Kalorien pro Kilogramm Gewicht, eventuell innerhalb noch weiterer Grenzen schwanken. Der Nahrungsbedarf ist ferner abhängig von der Größe der Körperoberfläche. Da nun kleine Tiere im Verhältnis zu ihrem Gewicht eine entsprechend größere Oberfläche besitzen als größere, so ist bei jenen auch der Nährstoffbedarf infolge relativ vermehrter Wärmeausstrahlung entsprechend größer. Die Größe des Stoffverbrauches der Tiere findet unter im übrigen gleichen Bedingungen einen Ausdruck in der Formel $\sqrt[3]{M^2}$, d. h. also: Es ist der Stoffverbrauch gleich der dritten Wurzel aus dem Quadrat des Gewichtes.

Benutzt man erwachsene Versuchstiere, so wird man vielfach mit dem Versuch beginnen, wenn die Tiere sich im N-Gleichgewicht befinden, d. h. also, wenn der N-Gehalt des Futters gleich ist dem N-Gehalt des Harnes + dem N-Gehalt der Fäzes + dem N-Gehalt der Epidermisgebilde. Ein Hund vermag sich noch mit ca. 1·25 *g* verdaulichem Eiweiß pro Kilogramm Lebendgewicht in das Stickstoffgleichgewicht zu setzen, wenn er genügende Mengen an N-freien Stoffen erhält. Bei reiner Fleischkost sind jedoch ca. 8—10 *g* Protein zur Erreichung des N-Gleichgewichts erforderlich. Der Zeitpunkt, wann das N-Gleichgewicht erreicht ist, hängt ab

von dem Ernährungszustand des Tieres und von der Menge und Zusammensetzung des während der letzten Wochen vor Beginn der Versuchsanstellung aufgenommenen Futters. Häufig wird das N-Gleichgewicht in wenigen Tagen erreicht, eventuell jedoch erst in mehreren Wochen, besonders dann, wenn das Futter arm an N-haltigen Nährstoffen ist und der Hund bis zum Beginn des Versuchs eiweißreiches Futter erhalten hatte. In vielen Fällen, speziell dann, wenn man den Verdauungskoeffizienten bzw. die Verwertung z. B. eines Eiweißkörpers bestimmen will, wird man dem Tier eine Anzahl Tage ein Grundfutter reichen und die täglichen N-Bilanzen ermitteln, hierauf erhält der Hund als Zulage zum Grundfutter den betreffenden Eiweißkörper in entsprechender Menge während der folgenden Periode, und es werden die gleichen Bestimmungen ausgeführt; aus der Differenz der im Mittel pro die der Grundfutterperiode und der Hauptperiode erhaltenen Werte läßt sich der Verdauungskoeffizient des betreffenden Eiweißkörpers und ferner der durch die Eiweißzufuhr bewirkte N-Ansatz leicht berechnen. In analoger Weise werden die Verdauungskoeffizienten der N-freien Stoffe (des Fettes, der N-freien Extraktstoffe) und der Mineralbestandteile des Futters aus der Differenz im Gehalt des Futters und der Fäzes hieran bestimmt. Der Fettansatz läßt sich nur auf Grund der N-Bilanz und der C-Bilanz ermitteln.

Wenn hervorgehoben wurde, daß es häufig wünschenswert ist, die Tiere vor Beginn des Versuches in das sogenannte N-Gleichgewicht zu bringen, so ist das doch nicht immer erforderlich; auch bei kontinuierlichem N-Ansatz, der ja bei wachsenden Individuen unter normalen Lebensbedingungen stattfindet, oder auch bei kontinuierlichem N-Verlust kann der Versuch beginnen; nur dürfen die Differenzen der einzelnen Tageswerte der Bilanzen nicht zu groß sein und z. B. bei einem ca. 5—6 *kg* schweren Hund, bei einem Gehalt des Futters von 4—5 *g* N nicht erheblich mehr als 0·2—0·3 *g* N betragen und möglichst gleichmäßig steigende oder fallende Tendenz haben. Unter Umständen ist eine Unterernährung des Tieres oder eine Hungerperiode [1]) vor Beginn des Versuchs sogar wünschenswert, z. B. dann, wenn man die Verwertung von Stoffen, die nicht gern aufgenommen werden, feststellen und möglichst günstige Bedingungen für die Ausnutzung derselben schaffen will. Es sei zunächst einmal an einem Beispiel die Bestimmung der Verdauungskoeffizienten und der Ausnutzung N-haltiger Nährstoffe erläutert:

Eine 5·11 *kg* schwere Hündin erhielt während 6 Tagen nach entsprechender Vorfütterung ein Grundfutter, bestehend aus:

[1]) Am ersten, bisweilen auch noch am zweiten Tage einer Fütterungsperiode, welche unmittelbar auf eine längere Hungerperiode folgt, ist der N-Gehalt des Harnes gegenüber den späteren Tagen der Fütterungsperiode in auffallender Weise erhöht; auch die Zahlen für den N- und Kaloriengehalt der Fäzes sind bisweilen zu Beginn der Periode (eventuell mehrere Tage) anormal, nämlich zu niedrig. Der Darm resorbiert also nach längerem Ruhezustande eventuell stärker, als unter normalen Bedingungen. Diese Komplikationen sind bei Aufstellung der Bilanzen für die betreffende Periode zu berücksichtigen.

| | | | |
|---|---|---|---|
| 80·00 *g* Fleisch | mit 2·43 *g* N | und 104.000 | Kalorien |
| 99·10 *g* Reis | mit 1·07 *g* N | und 369.600 | " |
| und 20·00 *g* Schmalz | mit . . . . . | 190.065 | " |
| also . . . insgesamt | . 3·50 *g* N | und 563.665 | Kalorien pro die |

Im 6tägigen Durchschnitt wurden im Mittel pro die folgende Werte für die N-Ausscheidung und den N-Ansatz gefunden:

| im Harn | im Kot | in den Epidermisgebilden | Sa. |
|---|---|---|---|
| 2·77 *g* N | 0·44 *g* N | 0·04 *g* N | 3·25 *g* N |

Da das Tier 3·50 *g* N im Futter erhalten hatte, so betrug der N-Ansatz 3·50—3·25, also 0·25 *g*, das sind 7·14% des Futterstickstoffs. Der resorbierbare Anteil (Verdauungskoeffizient) der N-haltigen Futterbestandteile ergibt sich einfach aus der Differenz Futter = N—Kot = N.[1])

| | |
|---|---|
| Das Futter enthielt | 3·50 *g* N |
| die Fäzes enthielten | 0·44 *g* N |
| Es wurden also . | 3·06 *g* N |

resorbiert, entsprechend 87·43% der Zufuhr.

Im unmittelbaren Anschluß an diese Periode wurden der Verdauungskoeffizient und die Verwertung des Kaseins in einer 10tägigen Fütterungsperiode ermittelt. Die Hündin erhielt zu der genannten Grundration als Zulage pro die 8·78 *g* Kasein mit 1·00 *g* N und 43·53 Kalorien, also insgesamt 4·50 *g* N und 707.195 Kalorien.

Die N-Ausscheidungen bzw. der N-Ansatz betrugen im Mittel pro die:

| im Harn | im Kot | in den Epidermisgebilden | Sa. |
|---|---|---|---|
| 3·41 *g* | 0·52 *g* | 0·04 *g* | 3·97 *g* |

Der N-Ansatz betrug somit 4·50—3·97, also 0·53 *g*.

Der unverdauliche Anteil des Kaseinstickstoffs ergibt sich aus der Differenz im N-Gehalt der Fäzes der Grundfutter- und der Kaseinperiode: derselbe beträgt 0·52—0·44 = 0·08 *g*. Da 1 *g* N in Form von Kasein verfüttert worden war, so wurden also 1·00—0·08 = 0·92 *g* Kaseinstickstoff resorbiert, somit 92% der Zufuhr. In analoger Weise wird der durch die Kaseinzufuhr bewirkte N-Ansatz berechnet. Der N-Ansatz betrug in der Grundfutterperiode 0·25 *g*, in der Kaseinperiode 0·53 *g*. Von 1 *g* Kaseinstickstoff waren also 0·53—0·25 *g* = 0·28 *g* entsprechend 28% angesetzt worden.

Wir haben hier den Verdauungskoeffizienten und die Verwertung des Kaseins aus den differenten Werten zweier Perioden, einer Grundfutter-

[1]) In Wirklichkeit bestehen die N-haltigen Verbindungen der Fäzes nicht nur aus unverdauten N-haltigen Futterbestandteilen, sondern der Kot enthält außerdem N-haltige Stoffwechselprodukte, Gallensekret, Darmepithelien etc. Aus dem Vergleich der bei der natürlichen und bei der künstlichen Verdauung erhaltenen Werte kann man den Gehalt der Fäzes an N-haltigen Stoffwechselprodukten annähernd bestimmen. Ebenso enthält der Kot auch ätherlösliche Stoffe, die nicht dem Futter entstammen.

periode und einer Hauptperiode bestimmt. Nun ist es eventuell erforderlich, daß man der Hauptperiode nicht nur eine Grundfutterperiode vorausgehen, sondern auch noch eine solche auf die Hauptperiode unmittelbar folgen läßt, und zwar besonders dann, wenn die Perioden von sehr kurzer Dauer sind und man annehmen kann, daß von der Mehrzufuhr an N in der Hauptperiode noch ein Anteil vorübergehend im Körper retiniert wird und erst zu Beginn der folgenden Periode zur Ausscheidung im Harn gelangt. Das an den ersten Tagen der Nachperiode im Vergleich zu späteren Tagen derselben im Harn erschienene Plus an Stickstoff ist der Hauptperiode zur Last zu schreiben.

Bei der Ausführung von Stoffwechselversuchen ist es sehr wichtig, daß die Tiere möglichst unter physiologischen Bedingungen gehalten werden und ihnen somit auch während der Versuche täglich wenigstens die notwendigste Bewegung ermöglicht wird, sofern Ruheversuche nicht Vorbedingung sind. Bei Wiederkäuern ist das ja allerdings nur schwer durchführbar, bei Hunden dagegen sehr leicht, und wird, wie wir sehen werden, die Gewinnung und quantitative Trennung der Exkremente wesentlich erleichtert, wenn man die Tiere auf einer Tretbahn laufen läßt. Ich habe schon seit einer Reihe von Jahren die Hunde bei sämtlichen Versuchen täglich ca. 3 *km* auf der horizontal gestellten Tretbahn in mäßigem Tempo laufen lassen. Es bleiben die Tiere auch viel länger gesund und für den Versuch verwendbar, als wenn sie dauernd im Käfig bleiben müssen. Ich halte folgendes Verfahren bei Stoffwechselversuchen an Hunden für zweckmäßig und habe dasselbe im wesentlichen in einer früheren Publikation bereits beschrieben[1]):

Nachdem der Versuchsplan festgelegt ist, wird das Futter analysiert und vorbereitet. Da Fleisch einen Hauptbestandteil des Futters auszumachen pflegt, wird man sich von demselben, um es während des ganzen Versuches in gleichmäßiger Beschaffenheit zur Verfügung zu haben, ein entsprechendes Quantum beschaffen, es durch die Hackmaschine gehen lassen, es in Tagesportionen oder in Portionen, die für mehrere Tage bestimmt sind, genau abwägen, in Konservengläser bringen und dieselben im strömenden Wasserdampf fraktioniert sterilisieren.

Zweckmäßig wird das in Tagesportionen gewogene Grundfutter für 5 Tage vorbereitet und täglich nur die für die Hauptperioden bestimmten Zulagen abgewogen, um sie mit jeder Tagesportion zu vermischen. Um ein Verderben des Futters auszuschließen, wird folgendermaßen verfahren: Eine für 5 Tage bestimmte Quantität, z. B. Reis, Schmalz und Mineralbestandteile, wird abgewogen, in ein Gefäß von bekanntem Gewicht gebracht, mit einer bestimmten Menge Wasser übergossen und im strömenden Dampf gargekocht. Hierauf wird das für 5 Tage bestimmte Fleisch aus einem Konservenglas entnommen, sorgfältig untermischt und das Futter nach der Ab-

[1]) *W. Völtz*, Über den Einfluß verschiedener Eiweißkörper und einiger Derivate derselben auf den N-Umsatz, mit besonderer Berücksichtigung des Asparagins. *Pflügers* Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **107**. S. 367—369 (1905).

kühlung in 5 Tagesportionen von gleichem Gewicht in emaillierte Schüsseln gewogen. Die Schüsseln werden sodann mit Deckeln aus verzinntem Kupferblech von der Form der Deckel der Petrischalen bedeckt, sterilisiert und im Eisschrank aufbewahrt. Vor der Verfütterung werden die Portionen angewärmt. Nachdem das Tier das für die erste Periode bestimmte Futter eine entsprechende Anzahl Tage regelmäßig zu derselben Stunde in einem Vorversuch erhalten hat, beginnt der Versuch zu einer bestimmten Zeit, und zwar 24 Stunden nach der letzten Futteraufnahme. Der Käfig ist vorher sorgfältig gereinigt worden, unter die für den Abfluß des Harns bestimmte Ausflußöffnung wird ein mit einigen Kubikzentimetern Salzsäure

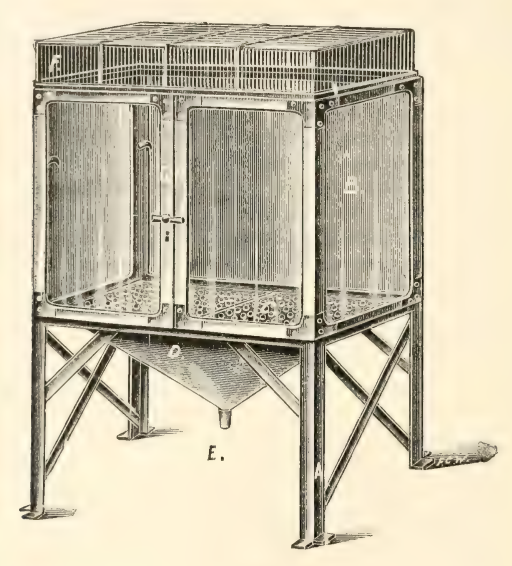



Fig. 283.

beschickter Glaszylinder gestellt. Von den vielen verschiedenen im Gebrauch befindlichen Käfigen ist der nach den Angaben von *Abderhalden* hergestellte, aus verzinktem Eisen (Fig. 283 *A*) mit Glaswänden (Fig. 273 *B*) bestehende Käfig wohl am meisten zu empfehlen. Der Käfig hat einen, mit kreisförmigen Löchern durchstanzten, herausnehmbaren Boden (Fig. 283 *C*), welcher gegenüber den Gitterstäben den Vorteil hat, daß der Kot leichter quantitativ gewonnen werden kann. Unter diesem Boden befindet sich ein zweiter aus verzinktem Eisenblech (Fig. 283 *D*), welcher trichterförmig zum Abflußrohr (Fig. 283 *E*) für den Harn verläuft. Fig. 283 *G* und 283 *H* Türen, Fig. 283 *F* Aufsatz aus verzinkten Gitterstäben. Wenn man den Harn täglich

durch Katheterisieren[1]) des Tieres abgrenzen will, was sehr wünschenswert, eventuell überhaupt notwendig ist, wird man meistens Hündinnen als Versuchstiere wählen, weil Hunde schwerer zu katheterisieren sind. Jedoch gelingt auch das Katheterisieren männlicher Hunde, selbst wenn sie ziemlich klein sind, bei einiger Übung und bei Verwendung geeigneter Katheter meistens ganz gut. Ist das Katheterisieren z. B. infolge Vaginismus sehr erschwert, so wird man zweckmäßig wenigstens zu Beginn und beim Schluß jeder Periode den Harn nach der von *Zuntz*[2]) vorgeschlagenen Methode abgrenzen. Man bringt zu dem Zweck, je nach der Größe des Tieres, ca. $^1/_2$—1 *l* Wasser mittelst Schlundsonde in den Magen, und zwar 2 Stunden vor Beginn des Versuches. Unmittelbar vor Beginn der Versuchsanstellung wird das Tier zum Urinieren herausgelassen. Ebenso wird 2 Stunden vor Schluß der Periode verfahren, und wird dann der 2 bis $2^1/_2$ Stunden nach der Wasseraufnahme in den Käfig gelassene Harn gesammelt und mit dem Harn des betreffenden Tages vereinigt.

Beim Katheterisieren sind einige Kautelen erforderlich, vor allem sind die Instrumente zu sterilisieren oder zu desinfizieren und das zum Ausspülen der Blase bestimmte Wasser zu sterilisieren, um eine Cystitis auszuschließen und auf Körpertemperatur zu bringen. Um das Katheterisieren möglichst zu erleichtern und Harnverluste zu vermeiden, empfiehlt sich folgende Einrichtung: Das Tier wird vom Diener auf einen Tisch gehoben, vor dem der Versuchsansteller auf einem Stuhl Platz nimmt. Auf dem Tisch (Fig. 284) befindet sich ein Aufsatz, welcher einen Bunsenbrenner, einen Dreifuß mit Drahtnetz und hierauf einen gläsernen Stehkolben von 1—2 *l* Inhalt trägt (Fig. 284 *A*); der Kolben enthält sterilisiertes Wasser und einen Glasheber (Fig. 284 *B*), der zu einem Gummischlauch führt. In den Flaschenhals wird ein Wattebausch gebracht, um das Eindringen von Mikroorganismen zu verhindern. Der Wattebausch fixiert gleichzeitig ein in das Wasser reichendes Thermometer. Der Kolben steht etwa 1 *m* höher als der Tisch. Der Gummischlauch wird an einem gläsernen T-Rohr angebracht, dessen zweiter Schenkel mittelst eines kurzen Schlauches (Fig. 284 *D*) zu einem Glasröhrchen führt, welches in einem durchbohrten Kork befestigt ist. Der Kork dient als Verschluß zu einer Flasche (Fig. 284 *E*), die seitlich am Tisch angebracht werden kann und zur Aufnahme des Harns bestimmt ist. Auf den dritten Schenkel des T-Rohres wird der kurze Schlauch (Fig. 248 *C*) aufgestreift, welcher in den Katheter übergeht. Die zum Katheter und zum Harnglas führenden Schläuche sind durch Quetschhähne abzusperren; vor Beginn des Katheterisierens werden Katheter, Schläuche und der Heber desinfiziert, das vorher durch Kochen sterilisierte Wasser auf 38° C ge-

---

[1]) Soweit ich aus der Literatur ersehen konnte, sind Hündinnen zuerst von *Falck* (Arch. f. path. Anat. Bd. **9**. S. 57 [1856]) katheterisiert worden, und zwar nach Spaltung des vorderen Teiles der Urethra. Diese Operation ist allerdings zum mindesten gänzlich überflüssig (D. Verf.).

[2]) *Pollitzer*, Über den Nährwert einiger Verdauungsprodukte des Eiweißes. *Pflügers* Arch. Bd. **37**. S. 303.

bracht und der Quetschhahn des zum Katheter führenden Schlauches geöffnet, um das im Innern des Hebers und Schlauches befindliche kalte

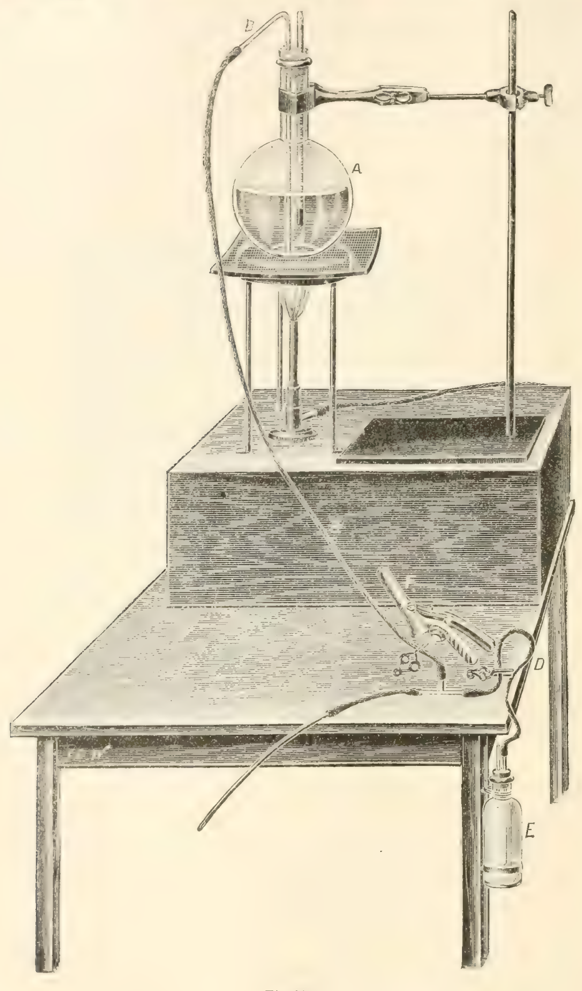



Fig. 284.

Wasser zunächst abfließen zu lassen. Sodann klemmt man den oberhalb des **T**-Rohres befindlichen Schlauch (Fig. 284 *B*) zu und kathe-

terisiert das von einem Diener gehaltene Tier, nachdem man den Quetschhahn von dem Schlauch (Fig. 284 *D*) entfernt hat, der zum Harngefäß führt. Bei kleinen Hündinnen wird das Katheterisieren wesentlich dadurch erleichtert, daß man sich eines sterilen Spekulums bedient. Nachdem die Blase entleert ist, wird dieselbe mehrfach ausgespült, bis die abfließende Flüssigkeit farblos ist. Man spült die Blase aus, indem man den zum Harnglas führenden Schlauch zunächst absperrt und die zum Heber und zum Katheter führenden öffnet, bis eine genügende Quantität Wasser in die Blase gelangt ist, hierauf schließt man den zum Heber führenden Schlauch und öffnet den zum Harnglas führenden. Die vollständige Entleerung der Blase erfolgt dadurch, daß man die Daumen auf die Gegend der Lendenwirbel des Tieres legt und mit den übrigen Fingern auf die Blase einen allmählich zunehmenden Druck ausübt. In Fig. 284 *F* und Fig. 285 *SP* ist ein Spekulum dargestellt, welches sich beim Katheterisieren von Hündinnen gut bewährt hat. Es empfiehlt sich nach der Einführung des geschlossenen Spekulums (Fig. 285), letzteres an dem Griff etwas zu heben, so daß die Längsachse des Spekulums ungefähr parallel zur Horizontalen verläuft. Hierauf dreht man die Schraube, bis sich die Papille der Urethra aus dem entstehenden Schlitz hervorwölbt (Fig. 285 *U*). Es ist dann der Katheter durch den oberen Schlitz des Spekulums im spitzen Winkel (Fig. 285 *K*) zur Längsachse des Instruments in die Urethra leicht einzuführen. Sehr kleine Hündinnen mit enger Vagina pflegen an den ersten Tagen den Rücken stark zu krümmen und dadurch das Katheterisieren zu erschweren. Die Tiere können jedoch ebenfalls leicht katheterisiert werden, wenn nach Anästhesierung der Vagina durch eine Kokainlösung ein zweiter Gehilfe durch Umfassen beider Oberschenkel der Hündin und mit den Daumen auf die Sitzbeine bewirktem Druck das Becken streckt. Sehr bald lassen sich auch solche Tiere ohne weiteres katheterisieren. Das Katheterisieren ist bei einiger Übung nach wenigen Minuten beendet. Wenn man bei männlichen Hunden das tägliche Katheterisieren, welches namentlich bei kleinen Tieren infolge der Feinheit der Katheter etwas zeitraubend ist, umgehen, jedoch den Harn täglich abgrenzen will, so wird man den Hund jedenfalls zu Beginn und nach Abschluß jeder Fütterungsperiode entweder katheterisieren oder den Harn nach dem Vorschlag von *Zuntz* (l. c.) ge-

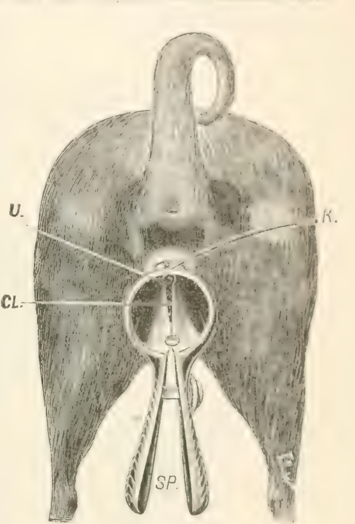


Fig. 285.

winnen. An den einzelnen Tagen jeder Periode erfolgt dann die Ablagerung des Harnes zweckmäßig in folgender Weise: Dem Hund wird ein besonders konstruierter Harntrichter (Fig. 286) umgeschnallt (siehe Fig. 287), der durch einen Riemen hinreichend fixiert wird. Der Trichterrand besteht aus einem starken Messingdraht (Fig. 286 *E*), der zu einem Ringe der aus Fig. 286 ersichtlichen Form gebogen und mit der aus Zinkblech bestehenden Trichterwand (Fig. 286 *A*) verlötet wird. Der Trichter reicht etwa vom Processus xiphoideus des Brustbeins bis vor das Skrotum und paßt Hunden recht verschiedener Größe. Die parallelen Seitenflächen des Trichters werden über den Penis geschoben, so daß letzterer dem Trichterboden aufliegt; hierauf schnallt man den Riemen in der Lendengegend fest. An das vordere Ende des Trichterbodens ist ein Ansatzrohr

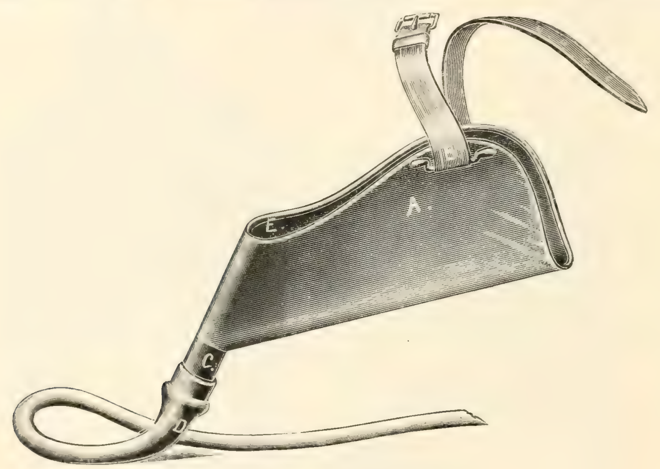



Fig. 286 (1/3 der natürlichen Größe).

(Fig. 286 *C*) von ca. 1 *cm* Durchmesser gelötet, auf das ein Gummischlauch (Fig. 286 *D*) gestreift wird. Man bringt nun den Hund auf die gleich zu beschreibende Tretbahn und führt den Schlauch durch die seitliche Durchbohrung eines Brettes in ein auf dem Boden stehendes zur Aufnahme des Harns bestimmtes Gefäß (Fig. 287 *C*). Hierauf läßt man den Hund durch Anstellen des Motors laufen. Erfahrungsgemäß urinieren Hunde meist leicht, sobald sie ein Stück Weges zurückgelegt haben; man stellt dann den Motor sofort ab und kann den Harn leicht restlos auffangen, indem man zuletzt Trichter und Schlauch mit angesäuertem Wasser durchspült. Handelt es sich um ein neues Versuchstier, das sich an die Apparatur und die Tretbahn noch nicht gewöhnt hat, so beläßt man dasselbe an einigen Tagen vor der Versuchsanstellung so lange auf der Tretbahn, auf der man es ab und zu laufen läßt, bis die Scheu vor dem Urinieren über-

wunden ist. Auf diese Weise gelingt die Abgrenzung des Harnes der einzelnen Tage leicht. Daß eventuell geringe Harnmengen in der Blase zurückbleiben, ist belanglos, da dieselben am folgenden Tage gewonnen werden. Den Kot setzen die Hunde ebenfalls auf der Tretbahn in ein untergehaltenes Gefäß ab, nachdem sie eine Weile gelaufen sind.

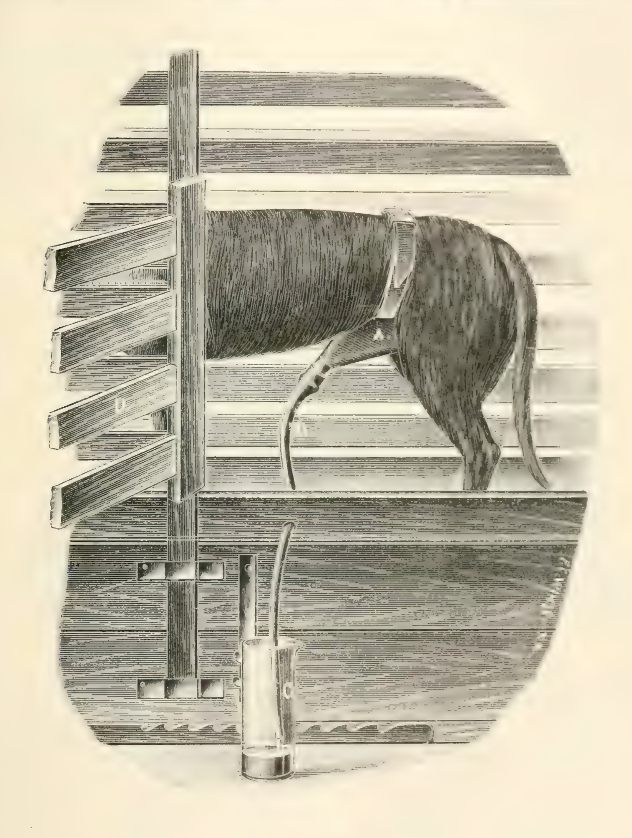


Fig. 287.

Hündinnen werden stets unmittelbar nach dem Katheterisieren täglich zu der gleichen Zeit auf die Tretbahn gebracht. Der Diener hält ein für die Aufnahme der Fäzes bestimmtes Gefäß bereit, und man läßt die Tretbahn langsam angehen. Nach kurzer Zeit wird das Tier sich zur Defäkation anschicken, man stellt den Motor ab und der Kot wird in dem

Gefäß direkt aufgefangen. Bei diesem Vorgehen läßt sich jeder Hund das Unterhalten des Kotgefäßes nach wenigen Tagen gefallen. Da die meisten Tretbahnen die Ruhe der Laboratorien durch starkes Klappern unliebsam stören, hat Prof. *C. Lehmann* eine Tretbahn konstruiert und bauen lassen (Fig. 288 und 289), die wenig Geräusch macht und die sich für kleine Tiere gut bewährt hat.

Die durch Scharniere verbundenen Holzbretter, welche den Boden der Tretbahnen zu bilden pflegen, sind hier ersetzt durch eine Leinwand aus Segeltuch (Fig. 289 *E*), die beiderseitig zwischen die Glieder von Radfahrketten genäht ist. Die beiden Ketten, welche die gleiche Gliederzahl haben, werden durch zwei Zahnräder bewegt (Fig. 289 *B*), welche an den Stirnseiten einer hölzernen Welle von gleichem Radius wie das Zahnrad fixiert sind. Die Zahnräder führen die Ketten mit der zwischengenähten Leinwand

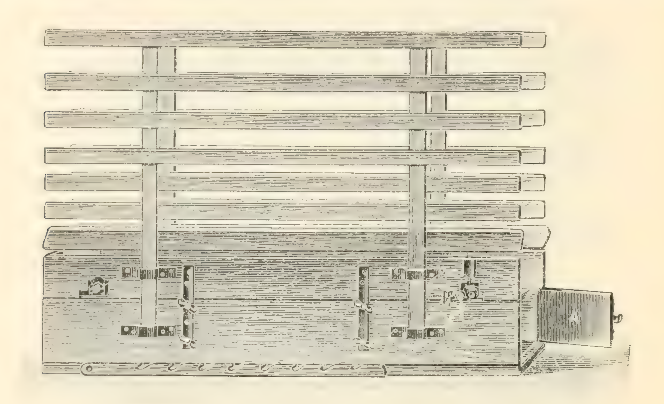


Fig. 288.

über die zweite Holzwelle (Fig. 289 *C*) am anderen Ende der Tretbahn. An der einen Seite der ersteren Welle sind außerdem noch drei weitere Zahnräder verschiedener Größe (Fig. 289 *B*) angebracht, um die Geschwindigkeit zu variieren. Das eine oder andere dieser Zahnräder steht durch eine Radfahrkette mit dem Zahnrad des Vorgeleges in Verbindung, welches durch einen Elektromotor betrieben wird. Noch zweckmäßiger ist es, einen Motor mit geringer Tourenzahl (ca. 500) direkt mit einer in der Längsrichtung beweglichen eisernen Achse zu koppeln, welche je nach der Einstellung eine schnellere oder langsamere Umdrehung einer Friktionsscheibe bewirkt, die an der verlängerten Achse der Holzwelle statt der Zahnräder befestigt ist. Außer der leichteren Regulierung der Geschwindigkeit der Tretbahn wird hierdurch namentlich auch Raumersparnis bewirkt. Die Leinwand ruht auf einem Brett (Fig. 289 *D*) bzw. wird über ein Brett geschleift.

welches zwischen den Radfahrketten und den Holzwellen durch die Seitenwände (Fig. 289 *H*) der Tretbahn mittelst zweier, auf der Fig. 289 sichtbarer Querleisten fixiert ist. Um die Reibung und die Abnutzung der Leinwand auf dem Brett zu verringern, ist auf letzteres ein Aluminiumblech aufgenagelt. Da die Hunde sich bisweilen zu Anfang sträuben, auf der Tretbahn zu laufen und ihre Füße gegen die Leinwand stemmen, kann es vorkommen, daß die Ketten infolge Verkürzung der Leinwand einige Zentimeter seitlich aufeinander zu verschoben werden und erfolgt dabei eventuell das Aushaken einer Kette aus dem Zahnrad.

Das Aushaken wird dadurch vermieden, daß man zwischen die Ketten in einer Entfernung von ca. 25 *cm* Holzbrettchen von ca. 3 *cm* Breite und 0·5 *cm* Stärke auf die Leinwand durch übergenähte Leinwandstreifen fixiert

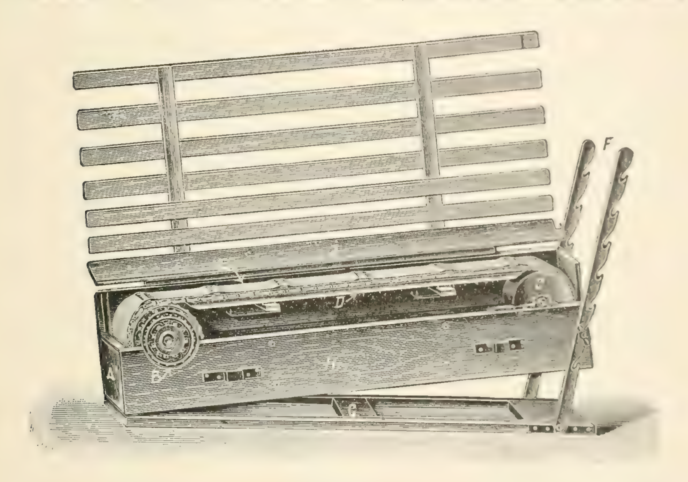



Fig. 289.

(Fig. 289). Die Leinwand braucht erst nach 1—2 Jahren ersetzt zu werden bei täglicher Benutzung der Tretbahn. Die Tretbahn ist, wie aus Fig. 289 *G* und *F* ersichtlich, auch für die Leistung von Steigarbeit eingerichtet, eine Welle bewegt den Tourenzähler (Fig. 288 *E*), damit man die zurückgelegte Entfernung messen kann. Man kann sich, falls die Arbeitsleistung nicht sehr genau bestimmt werden muß, eines billigen Tourenzählers für Fahrräder bedienen, der leicht zu kalibrieren ist. An dem hinteren Rahmen der Tretbahn ist eine kleine Türe (Fig. 288 *A*) angebracht, um, falls es einmal vorkommen sollte, daß Kot auf die Tretbahn fällt, letzteren leicht gewinnen zu können. Die untersten Leisten des seitlichen Gitters (Fig. 289 *J*) sind abzuschrägen, damit die Tiere bei einem etwaigen Versuch, sich auf die Leisten des Holzgitters zu stellen, sofort wieder auf die Bahn zurück-

gleiten. Nachdem der Hund die vorgeschriebene Entfernung (ca. 3 *km* täglich genügen, um das Tier längere Zeit gesund zu erhalten) mit eventuell 1 oder 2 Pausen auf der Bahn zurückgelegt hat, wird er gewogen, in den Käfig gebracht und erhält hierauf eine kleine Portion der Tagesration, unter welche die zur Abgrenzung der Fäzes bestimmte Substanz gemischt ist. Einige Stunden später wird das übrige Futter vorgesetzt. Zur Abgrenzung benutzt man meistens Kieselsäure, pulverisierte Kohle oder Knochen [1]) etc. [2]) Falls der Kaloriengehalt der Fäzes bestimmt werden soll, ist es natürlich erforderlich, auch den Kaloriengehalt der zur Abgrenzung bestimmten Kohle zu ermitteln und genau gewogene Mengen zur Abgrenzung des Kotes zu verwenden. Reicht man Knochen, was schon in diätetischer Hinsicht sehr zu empfehlen ist, so hat man ebenfalls eine abgewogene Menge von gleichmäßiger Beschaffenheit und bekannter Zusammensetzung zu verfüttern. Ich beschaffe mir eine größere Quantität Knochen, trockne dieselben, lasse sie mahlen, entferne die Hauptmenge des Fettes durch Übergießen mit kaltem Äther und Abfiltrieren und bestimme in der verbleibenden Substanz N- und Kaloriengehalt. Am zweiten und an den folgenden Versuchstagen wird das Tier natürlich zu der gleichen Zeit katheterisiert und kommt hierauf auf die Tretbahn. Es wird bei Beginn des zweiten Versuchstages eine flache Porzellanschale bereitgehalten, um nach der Defäkation die Abgrenzung des Kotes genau auszuführen. Der vor dem Erscheinen der abgrenzenden Substanz abgesetzte Kot wird entfernt, der übrige quantitativ in ein mit Porzellanspatel beschicktes, gewogenes Zylinderglas gebracht, mit verdünnter Salzsäure angesäuert und in den Eisschrank gestellt. Den Fäzes darf nur soviel verdünnte Salzsäure zugesetzt werden, daß sie von dickbreiiger Beschaffenheit bleiben, weil andernfalls die Entnahme von Durchschnittsproben erschwert wird. Der etwa in den Käfig gelassene Harn ist zum größten Teil in das untergestellte Glasgefäß gelaufen; die in dem Käfig zurückgebliebenen Reste werden mit angesäuertem Wasser mit Hilfe einer Bürste quantitativ ausgespült und mit dem durch Katheterisieren gewonnenen und dem aus dem Käfig abgelaufenen Harn vereinigt, filtriert, auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und analysiert. Den Kot setzen die Tiere bei Benutzung der Tretbahn mit seltenen Ausnahmen nur dann in den Käfig ab, wenn laxierende Futterstoffe gereicht werden; derselbe ist dann natürlich, wenn keine Untermischung mit Harn erfolgt ist, nach der Gewinnung des letzteren mit Hilfe einer Bürste und angesäuertem Wasser quantitativ zu entfernen und in das dazu bestimmte Zylinderglas zu bringen. Gelingt die Trennung vom Harn nicht, so kann man natürlich an diesem Tage nur die N-Bilanz aus der Summe der Nährstoffeinnahmen und Ausgaben aufstellen, muß

[1]) Die Knochen werden ohne vorherige Mischung mit Futter ca. 2—3 Stunden vor Verabreichung desselben direkt gegeben.

[2]) Siehe auch *R. Tigerstedt,* Physiologie des Stoffwechsels in *W. Nagels* Handb. d. Physiol. d. Menschen. Bd. **1**. 2. Hälfte. 1. Teil. S. 341—342.

dagegen auf die gesonderte Ermittelung des resorbierbaren Anteils der Nährstoffe und der umgesetzten Menge des Nahrungsstickstoffs verzichten.

Es ist empfehlenswert, das angesäuerte Wasser zum Spülen in eine 5—10 *l* fassende Flasche zu füllen und letztere 1—2 *m* über dem Käfig anzubringen; mittelst Hebers und Gummischlauches, der auf eine kurze, ausgezogene Glasröhre gestreift wird, kann man das Wasser in feinem, scharfem Strahl leicht in alle Teile des Käfigs spritzen, bei gleichzeitiger Anwendung der Bürste; der Boden des Käfigs ist zwecks quantitativer Gewinnung der Harnreste aufzurichten und beiderseitig zu reinigen. Hierauf wird der Schlauch zugeklemmt und aufgehängt, das untergestellte Harnglas erst nach völligem Ablaufen des Spülwassers entfernt und durch ein zweites ersetzt. Der Hund hat inzwischen unter Aufsicht die vorgeschriebene Entfernung auf der Tretbahn zurückgelegt, er wird gewogen, in den Käfig gebracht und erhält sein Futter.

Den Harn filtriere ich mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe in einen *Erlenmeyer*schen Druckkolben; zu dem Zwecke wird ein mit Glaswolle beschickter, gewogener Glastrichter mittelst durchbohrten Gummistopfens mit dem Kolben verbunden und der Harn filtriert. Auf dem Filter bleiben Haare und Epithelien zurück, die nach Beendigung der Periode analysiert werden. Der filtrierte Harn wird, wie gesagt, auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und analysiert, ein aliquoter Teil nach Zusatz von Thymol (nach Vorschlag von *Tangl*) in einer entsprechend etikettierten Flasche zwecks eventueller späterer Analysierung aufbewahrt. Ich möchte noch besonders darauf hinweisen, daß das Ansäuern des Harns, falls letzterer nicht bei sehr niedriger Temperatur aufbewahrt werden kann, unbedingt erforderlich ist, wenn man denselben später analysieren will.[1]) Setzt man nur Thymol zu, so lassen sich Stickstoffverluste nicht vermeiden.

Der Kot vom zweiten und von den folgenden Versuchstagen wird direkt in dem dazu bestimmten Zylinderglas aufgefangen, die jedesmalige Tagesportion angesäuert, sorgfältig mit den Fäzes der früheren Tage vermischt, im Eisschrank aufbewahrt und nach Abschluß der Periode und erfolgter Abgrenzung frisch auf seinen N-Gehalt untersucht. Bei diesem Vorgehen, welches N-Verluste ausschließt, ist der Arbeitsaufwand nicht größer als bei der Trocknung des Kotes. Beim Trocknen des Kotes findet man fast stets N-Verluste (l. c. S. 368). Für die übrigen Analysen sind die Fäzes natürlich zu trocknen, und zwar möglichst bei vermindertem Druck und bei einer Temperatur nicht über 60° C.

Die Wägung des Versuchstieres hat entweder täglich oder doch jedenfalls zu Beginn und am Schlusse jeder Periode zu erfolgen, und zwar zu derselben Tageszeit, nach der Katheterisierung und Defäkation und vor der Futteraufnahme. Wenn die Hunde täglich auf der Tretbahn die not-

[1]) Ich habe nach bloßem Thymolzusatz erhebliche N-Verluste besonders dann nachweisen können, wenn ich nach wenigen Wochen den Harn in kleinen, mit Zelluloseblöckchen beschickten Gefäßen bei Zimmertemperatur im Vakuum über Schwefelsäure für die kalorimetrischen Bestimmungen eintrocknen ließ.

wendige Bewegung haben, pflegen sie die Tagesportion des Futters fast stets innerhalb weniger Minuten zu verzehren, und zwar auch bei längerer Versuchsdauer, so daß keine unliebsame Unterbrechung der Versuche zu befürchten ist, sofern dem Futter nicht Substanzen zugesetzt sind, die sehr ungern aufgenommen werden oder toxisch wirken. Wird die Nahrungsaufnahme verweigert, dann greift man am besten zur Schlundsonde. Man verbindet diese mit einer Spritze, die zum mindesten $^1/_3$ der Tagesportion aufnehmen kann und füllt zunächst die Sonde durch Druck auf den Spritzenstempel mit dem Speisebrei. Nun führt man die Sonde in den Magen ein.

## 2. Stoffwechselversuche an Wiederkäuern.

Infolge der Aufnahme voluminösen, rohfaserreichen Futters ist der Aufenthalt der Kontenta im Magendarmkanal des Wiederkäuers, welcher den natürlichen Ernährungsbedingungen zweckmäßig angepaßt ist, im Vergleich zum Karnivoren von erheblich längerer Dauer. Die unverdauten letzten Reste einer Ration werden erst nach 4—5 Tagen ausgeschieden und es können eventuell Futterbestandteile noch nach 2 Wochen in den Fäzes nachgewiesen werden, wenn z. B. nach rohfaserreicher Fütterung (Stroh) leicht verdauliches Grünfutter gereicht wird. Infolgedessen müssen die Vorfütterung und die einzelnen Fütterungsperioden von entsprechend längerer Dauer sein als beim Fleischfresser. Das ist aber noch aus einem anderen Grunde erforderlich. Während man nämlich, wie wir gesehen haben, beim Hunde Fäzes und Harn durch Verfütterung geeigneter Stoffe bzw. durch Katheterisieren scharf abgrenzen kann, ist das beim Wiederkäuer nicht möglich. Die etwa einer Futterportion beigemischte, zur Abgrenzung bestimmte Substanz würde in den 4 Magenabteilungen und im Darmkanal mit den dort bereits vorhandenen und später nachfolgenden Ingestis derartig vermischt werden, daß von der Abgrenzung einer bestimmten Ration, wie gesagt, nicht die Rede sein kann. Das Katheterisieren ist bei männlichen Wiederkäuern ausgeschlossen und bei weiblichen kaum ausgeführt worden. Bei letzteren stößt die Trennung der flüssigen von den festen Exkrementen auf Schwierigkeiten. Immerhin hat man auch schon früher, z. B. bei Milchkühen, durch geeignetes Wärterpersonal Kot und Harn bei der jedesmaligen Entleerung gesondert auffangen lassen *(C. Voit, M. Fleischer)*, und in neuerer Zeit sind z. B. von *O. Hagemann*[1]) brauchbare Harn- und Kotfänger für Milchkühe, von *G. Fingerling*[2]) solche für Ziegen und Schafe konstruiert und beschrieben worden; bisher wurden zum größeren Teil Stoffwechselversuche an kastrierten männlichen Tieren, Ochsen und Hammeln, ausgeführt. Für Versuche an Hammeln sind die von der Firma Klapproth, Göttingen, gelieferten Zwangsställe (Fig. 290) und die von F. Lehmann konstruierten Kotbeutel und Harntrichter empfehlenswert.

[1]) *O. Hagemann,* Physiologie der Haussäugetiere. S. 196. Verlag von E. Ulmer, Stuttgart 1906.

[2]) Zeitschrift für Biologie. Bd. 52. S. 83. 1909.

Der Stall ist ganz aus Eisen hergestellt, die Krippe (Fig. 290 *A*) aus verzinktem Eisenblech. Die Seiten des Stalles (Fig. 290 *H*) bestehen aus Eisenblech, das durch zwei gekreuzte Schienen verstärkt ist, die gleichzeitig zur Verstärkung des Rahmens dienen. Der Stall besteht aus zwei Abteilungen (Fig. 290 *K* und *J*), die vordere (Fig. 290 *K*) dient zur Aufnahme der Krippe, zu der man durch Öffnen einer Klappe (Fig. 290 *F*) leicht gelangen kann. Die beiden Abteilungen des Stalles sind getrennt durch eine senkrechte Scheidewand aus Eisenblech (Fig. 290 *D*), welche eine genügend große Öffnung zum Hindurchstecken des Kopfes des Versuchstieres besitzt. Diese Einrichtung verhindert, daß Futterbestandteile unter die Füße des Hammels gelangen. Die Abteilung des Stalles, in der das

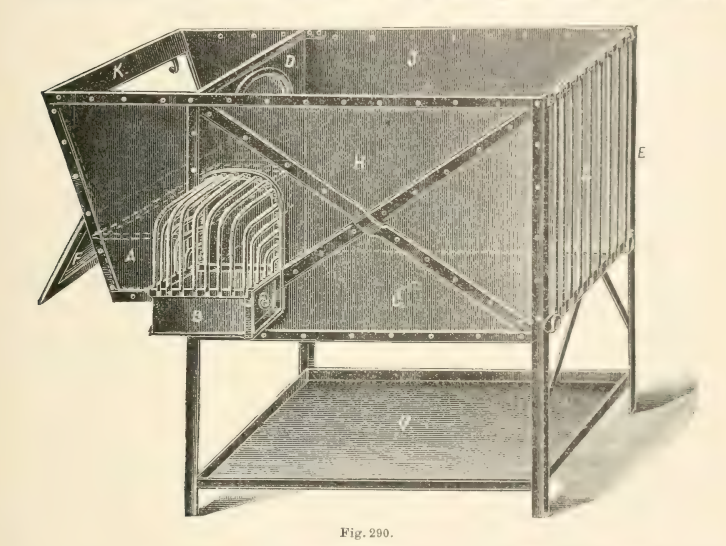



Fig. 290.

Tier steht, hat ferner eine seitliche Öffnung, um die Wasseraufnahme aus einem außerhalb des Käfigs angebrachten herausnehmbaren, übergitterten Gefäß zu ermöglichen, das aus Zinkblech besteht (Fig. 290 *B*). Die Rückwand bildet ein Fallgitter (Fig. 290 *E*). Der Fußboden hat in der Mitte eine Öffnung von ca. 3 *cm* Durchmesser (Fig. 290 *C*) zur Durchführung des Gummischlauches, welcher den Harn in ein Glasgefäß leitet, das auf einem zweiten Boden (Fig. 290 *G*) steht, der gleichzeitig zur Festigung der Füße des Zwangsstalles dient. Zur Fixierung des Kotbeutels und des aus Zinkblech oder auch aus Leder gefertigten Harntrichters dient ein besonderes Geschirr aus Leder, das mit Filz gepolstert ist. Der Kotbeutel besteht aus Sackleinwand, er wird einmal unterhalb des Anus fixiert und zwischen den Hinterschenkeln an entsprechenden Riemen befestigt und außerdem

mit angenähten Bändern um den Schwanz des Tieres gebunden. Die Fäzes können durch Aufknöpfen des Beutelbodens leicht vollständig in ein untergestelltes Gefäß entleert werden. Der Kotbeutel ist täglich mehrere Male zu entleeren, die Fäzes sind anzusäuern und in der Kälte aufzubewahren.

Auf die gleichmäßige Beschaffenheit und sehr sorgfältige Durchmischung, vor allem der Rauhfutterstoffe, wie Heu und Stroh, ist ganz besonderes Gewicht zu legen. Die genannten Futtermittel sind in Mengen, welche für die ganze Versuchsreihe ausreichen, mittelst einer Häckselmaschine zu feinem Häcksel zu schneiden; die gesamte Quantität ist auf einer genügend großen Fläche auszubreiten und oft durcheinander zu mischen; schließlich werden aus allen Teilen des Materiales Proben entnommen, diese vereinigt und zwecks der Entnahme einer Durchschnittsprobe für die Analyse in geeigneten Mühlen weiter zerkleinert. Futtermischungen dürfen nicht für die ganze Periode hergestellt werden, sondern es sind die verschiedenen Futterstoffe täglich gesondert zu wägen und unmittelbar vor der Verfütterung zu vermischen. Während der Fütterungsversuche ist der Wassergehalt des Rauhfutters ebenso eventuell des Körnerfutters mehrfach zu bestimmen, da nicht unerhebliche Abweichungen von dem ursprünglichen analytischen Resultat vorkommen können. Diese Arbeit kann man sich dadurch ersparen, daß man am Tage der Probeentnahme die einzelnen Tagesrationen für die ganze Versuchsreihe in Säcke resp. Gefäße entsprechender Größe wägt. Oft genug lassen die Tiere Reste von namentlich grobstengeligen Futterbestandteilen in der Krippe zurück, die quantitativ gesammelt und analysiert werden müssen, da weder der Gehalt derselben an Trockensubstanz noch an sonstigen Bestandteilen dem gefundenen Durchschnittswert für das betreffende Futtermittel entspricht. Der Gehalt der Futterreste an Einzelbestandteilen ist von dem Gehalt des vorgesetzten Futters hieran in Abzug zu bringen.

Hackfrüchte, wie Kartoffeln und Rüben etc., sind bei längerer Versuchsdauer nicht nur mehrfach auf den Trockensubstanzgehalt zu untersuchen, sondern auch auf den Gehalt an den in Betracht kommenden Einzelbestandteilen, da bei der Atmung der Pflanzenteile organische Substanz verloren geht. Was den Bedarf an Nährstoffen anbelangt, so benötigen erwachsene Ochsen nach *Kellner* pro 1000 *kg* Lebendgewicht bei Erhaltungsfutter 15—21 *kg* Trockensubstanz, hierin 0·6—0·8 *kg* verdauliches Eiweiß, 0·1 *kg* verdauliches Fett und 7·5—9·5 *kg* verdauliche stickstofffreie Extraktstoffe plus Rohfaser. Der Wiederkäuer vermag sich also noch mit einer geringeren Eiweißmenge in das Stickstoffgleichgewicht zu setzen wie der Carnivor. Mastrinder erhalten in erwachsenem Zustande ca. 24—30 *kg* Trockensubstanz, mit 1·6 *kg* verdaulichem Protein, 0·7 *kg* verdaulichem Fett und 16 *kg* verdaulichen stickstofffreien Extraktstoffen inklusive Rohfaser. An Schafe sind ungefähr die gleichen Nährstoffmengen für die Gewichtseinheit zu verfüttern.

Die Tagesration ist den Tieren niemals auf einmal, sondern mindestens in fünf Portionen in entsprechenden Abständen und stets zu denselben

Zeiten vorzusetzen, die Quantität des aufgenommenen Wassers ist zu bestimmen.

Vor Beginn der Versuche ist dem Hammel die Wolle vom Kopf und von der Wamme abzuscheeren, um das Anhaften von Futterbestandteilen zu verhindern; ebenso muß die Wolle abgeschoren werden auf der vom Harntrichter bedeckten Fläche in der Umgebung des Penis und ferner auch auf den vom Kotbeutel bedeckten Stellen in der Umgebung des Anus, um die Exkremente quantitativ gewinnen zu können.

Im allgemeinen empfiehlt es sich, daß die Dauer der einzelnen Perioden nicht weniger als 14 Tage beträgt. Reicht man während aller Perioden das gleiche Grundfutter, z. B. Heu, und während der Hauptperioden nur verhältnismäßig geringe Mengen anderer Substanzen als Zulage zu der gleichen Heumenge, so genügen eventuell 8—10tägige Perioden. Man wird dann jedoch 2—3 Tage nach Abschluß der Hauptperiode die eventuelle Nachwirkung der verabreichten Futtermittel zu untersuchen haben, also erst am 3. oder 4. Tage der folgenden Grundfutterperiode mit der Aufstellung der Bilanz für letztere beginnen. Wenngleich der N-Gehalt der Fäzes der Herbivoren während der Trocknung nicht so erhebliche Verluste erfährt wie bei den Carnivoren, so halte ich es doch für erforderlich, auch den Kot der Wiederkäuer frisch auf seinen N-Gehalt zu untersuchen. Wenn man die Analysen nicht täglich ausführen kann oder will, hat man von jeder Tagesportion einen bestimmten Prozentsatz der Fäzes abzuwägen, anzusäuern und im Eisschrank aufzubewahren. Die Menge der gesamten Fäzes der Wiederkäuer ist zu groß, um aufbewahrt zu werden. Ich verfahre bei der Probenahme folgendermaßen: die gesamten Fäzes werden in einen entsprechend großen tarierten Glaszylinder gebracht und sofort gewogen. Hierauf werden dieselben in einer großen Porzellanreibschale schnell zerrieben und von der Durchschnittsprobe 2% des Gesamtgewichtes sofort in einen Glaszylinder gebracht, mit HCl angesäuert und in der Kälte aufbewahrt. Ebenso werden an den folgenden Tagen die gleichen Gewichtsprozente der Fäzes sorgfältig mit dem Kot der früheren Tage untermischt. Unmittelbar nach Abschluß der betreffenden Periode werden nach nochmaliger guter Durchmischung und Wägung Durchschnittsproben in Wägegläser gebracht und gleich auf ihren N-Gehalt untersucht; die für die übrigen Analysen bestimmten Kotproben sind bei vermindertem Druck und nicht zu hoher Temperatur zu trocknen. Vor der täglichen Entnahme des Harns aus dem Zylinder sind die vom Harntrichter bedeckte Fläche des Bauches, der Harntrichter und der von letzterem in den Harnbehälter führende Gummischlauch mit angesäuertem Wasser gründlich ab- resp. auszuspülen und das Spülwasser mit dem Harn zu vereinigen, der zweckmäßig mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe durch Glaswolle zu filtrieren ist. Die auf dem Filter eventuell verbleibenden ungelösten Harnbestandteile sind gesondert zu analysieren. Im übrigen ist bei der Vorbereitung des Harnes für die Analyse sowie bezüglich der Konservierung desselben für spätere Untersuchungen zu verfahren, wie in dem Kapitel über Stoffwechselversuche an Hunden angegeben.

## 3. Stoffwechselversuche an Vögeln.

Stoffwechselversuche an Vögeln stoßen insofern auf größere Schwierigkeiten, als Fäzes und Harn nicht ohne weiteres von einander zu trennen sind, da sie durch einen gemeinsamen Ausführungsgang, die Kloake, entleert werden. Man hat sich daher meistens darauf beschränkt, die vermischten Exkremente zu gewinnen und zu analysieren. Auf diese Weise gelingt es allerdings nur den N-Ansatz zu ermitteln und allenfalls die Verdauungskoeffizienten der Rohfaser festzustellen. Es gelingt jedoch nicht, z. B. den verdaulichen Anteil des Eiweiß mit Hilfe der Methoden von *Stutzer* resp. *Barnstein* zu bestimmen. In einem Versuch mit einem Hahn, bei dem ich bei ausschließlicher Roggenfütterung den Harn mit Hilfe der gleich zu besprechenden Methode rein gewonnen hatte, gingen bei der Eiweißbestimmung nach *Barnstein* rund 55% des Harnstickstoffs nicht in das Filtrat über, wurden also fälschlich als Eiweißstickstoff bestimmt. Auch die Verdauungskoeffizienten des Fettes lassen sich, wenn man den Harn nicht getrennt von den Fäzes gewinnt, nicht genau bestimmen. So fand ich beispielsweise in dem mit HCl schwach angesäuerten und bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Harn der erwähnten Roggenperiode 1·5% Ätherextrakt.

In den wenigen, bisher überhaupt vorliegenden Versuchen an Vögeln hat man, wenn wir zunächst von der Arbeit von *Paraschtschuk*, auf die ich noch kurz eingehen werde, absehen, die Exkremente entweder dadurch quantitativ gewonnen, daß man die Tiere durch entsprechende Vorrichtungen in hockender Stellung hielt und ein Gefäß unter die Kloake stellte *(Weiske)*, oder man hat sich damit begnügt, die Vögel einfach in Käfige zu bringen, welche einen Boden aus verzinktem Drahtnetz enthielten, durch den wenigstens der flüssige Anteil des Harnes und geringe Mengen der festen Ausscheidungen in einen darunter befindlichen ausziehbaren Blechkasten entleert wurden. Die auf dem Drahtnetz und an dem Körper der Versuchstiere befindlichen Exkremente suchte man durch sorgfältiges Abwaschen quantitativ zu erhalten, was immerhin seine Schwierigkeiten hat. Es kommt noch hinzu, daß nicht selten Futterbestandteile aus den Futternäpfen beim Aufpicken der Nahrung verstreut, mehr oder weniger mit den Exkrementen vermengt und dann bisweilen nicht leicht von ihnen getrennt werden können. Letzteren Übelstand kann man dadurch beseitigen, daß man den Vögeln das Futter in Nudelform in den Schnabel stopft, oder doch wesentlich einschränken, durch Verwendung zweckmäßiger Futternäpfe. So empfiehlt es sich, z. B. für Hühner, etwas größere Näpfe, wie üblich, zu wählen, welche bei runder oder quadratischer Grundfläche nach dem Rande der Öffnung zu konisch verlaufen, resp. schräge Seitenwände haben, so daß der Durchmesser der Öffnung ca. 2—5 *cm* geringer ist, als der des Bodens. Die Futtergefäße haben zweckmäßig ca. 12 *cm* Durchmesser am Boden, bei zirka 5 *cm* Höhe. Der Futternapf ist außerhalb des Käfigs so zu fixieren, daß das Huhn bei der Futteraufnahme den Hals durch eine ent-

sprechende Öffnung des Käfigs ziemlich weit herausstrecken muß. Durch einen passenden Aufsatz kann man außerdem das Herauswerfen von Futter an 3 Seiten des Napfes verhindern.

Nun ist es durchaus wünschenswert, Kot und Harn getrennt und quantitativ leicht aufzufangen. Beides gelingt, und zwar durch die Ausführung einer Operation, also die Schaffung eines Anus praeternaturalis, und durch Befestigung eines Kot- und eines Harnbeutels aus Gummi, welche den Tieren freie Bewegung und die Unterbringung derselben in jedem beliebigen, geräumigen Käfig gestatten.

Ich habe schon früher bei Hähnen einen Durchtritt für die Fäzes durch Schaffung eines Anus praeternaturalis hergestellt[1]) und die Methodik vor kurzem wesentlich verbessert. Die Tiere bleiben längere Zeit gesund, man kann mehrere Monate Stoffwechselversuche mit ihnen durchführen.

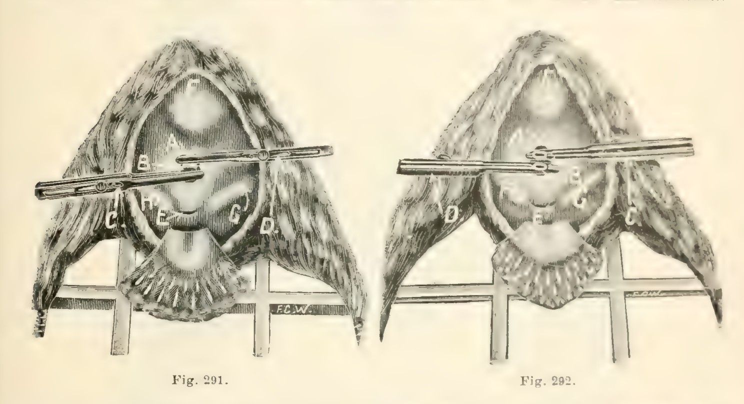



Fig. 291. Fig. 292.

Da die Operationsmethode (siehe die Fig. 291, 292 und 293) bisher von mir noch nicht publiziert worden ist, will ich dieselbe hier kurz schildern:

24 Stunden vor der Operation erhält das Tier nur Wasser. Die Federn sind zwischen Brustbein, Kloake und den Schenkeln ganz kurz abzuschneiden, ebenso die Schwanzfedern. Als Narkotikum ist Äther zu wählen, gegen Chloroformnarkose sind Hühner sehr empfindlich und gehen während derselben nicht selten zugrunde.

In der Mitte zwischen dem kaudalen Ende des Brustbeins (Processus xiphoideus) (Fig. 291 *F*) und der Kloake (Fig. 291 *E*) wird ein Schnitt von ca. 1 *cm* Länge in der Linea alba durch die Bauchdecken und das Peritoneum geführt, so daß der Darmkanal zutage tritt. Hierauf ist mittelst

---

[1]) *Simeon Paraschtschuk*, Die Verdauung des Mais bei Hühnern. Journ. f. Landw. Bd. **50**. S. 15—32 (1902). Herr *Paraschtschuk* hat allerdings vergessen zu erwähnen, daß ich die Tiere für seine Versuche operiert und ihm dadurch die Trennung von Fäzes und Harn ermöglicht habe. Selbst hat er diese Operation erst bei den späteren Versuchen ausgeführt.

einer gekrümmten Schere eine runde Öffnung von ca. 1 *cm* Durchmesser durch Bauchdecken und Peritoneum zu schneiden. Mit Hilfe eines krummen Fadenführers wird alsdann eine Schlinge des Rektums aus der Tiefe hervorgeholt und mittelst zweier Klemmpinzetten (Fig. 291 und Fig. 292 *C* u. *D*), die ein ca. 1 *cm* langes Darmstück zwischen sich lassen, fixiert.

Das Darmstück wird durch einen Querschnitt in der Mitte (Fig. 291 *B*) durchtrennt, das zur Kloake führende Ende (Fig. 292 *B*) vernäht und in die Bauchhöhle zurückgebracht.[1]) Der Rand des anderen Darmstückes (Fig. 292 *A*) wird in den Wundrand eingenäht, somit ist hier ein Anus praeternaturalis (Fig. 293 *A*) geschaffen, und sind die Tiere, wenn man nicht die einfachsten Regeln der Anti- resp. Asepsis außer Acht gelassen

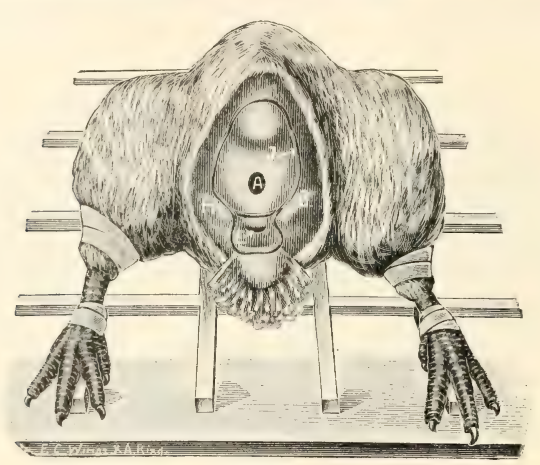



Fig. 293.

hat, nach wenigen Tagen gesund und können zu Stoffwechselversuchen benutzt werden.

Es ist notwendig, täglich nach Entfernung des Kotbeutels den Anus praeternaturalis zu bougieren, um eine Verengung desselben durch Vernarbung zu verhindern. Zur Befestigung des Kot- und des Harnbeutels ist ein verzinkter Draht zu benutzen, den man, entsprechend den anatomischen Verhältnissen des Tieres, biegt und lötet. Der obere, die Kloake umgebende Drahtring wird fixiert unterhalb der bügelförmigen Sitzbeine (*H* und *G* in Fig. 291, 292 und 293) des Huhnes, die er vollständig umgibt. Eine Verschiebung des Ringes wird durch daran befestigte kleine Lederriemen ver-

[1]) Die Ureteren führen erst kurz vor der Mündung der Kloake in letztere, so daß man überhaupt nur eine oberhalb ihrer Einmündung befindliche Darmschlinge herausbringen kann.

hindert, die an einen Leinwandgurt angeschnallt werden, der den Rumpf des Tieres umgibt. Der Gurt ist in seinem mittleren Teil, der den Thorax bedeckt, breit (Fig. 294), wird dann zweiteilig (Fig. 294 *E* u. *F*), um die Oberarme durch den Schlitz zu führen und also die Flügel frei zu lassen. Die Gurtenden werden auf dem Rücken des Tieres festgeschnallt. Der hintere Gurt (Fig. 294 *F*) trägt die Schnallen (Fig. 294 *C* und *D*), an denen Harnbeutel (Fig. 294 und 295 *A*) und Kotbeutel (Fig. 294 und 295 *B*) durch Riemen (Fig. 294 und 296 *C* u. *D*) befestigt werden.

Auf den unteren Rand des beschriebenen Drahtringes, welcher die Kloake umgibt und den Harnbeutel trägt, wird ein zweiter Drahtring nach

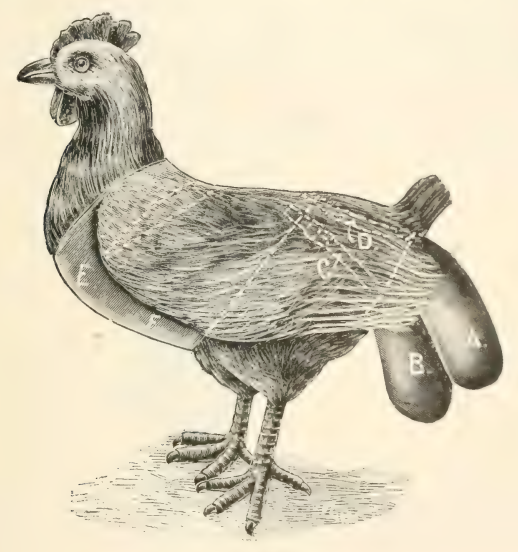



Fig. 294.

genauer Anpassung aufgelötet: derselbe umfängt den Anus praeternaturalis, trägt den Kotbeutel und wird, wie angegeben, ebenfalls durch Riemen an dem Leinwandgurt befestigt, wie aus Fig. 294 ersichtlich.

Eine sehr gute Fixierung des Harn- und Kotbeutels bewirkt man auch dadurch, daß man die zugehörigen Drahtringe am inneren Rande der Sitzbeine bei genauer Anpassung an letztere herum und durch die Lücke, welche sich zwischen den rudimentären Schambeinen befindet, hindurchführt, wie aus Fig. 293 *J* ersichtlich. Die Gummibeutel fassen je zirka 250—300 $cm^3$ und vermögen Kot und Harn eines Tages aufzunehmen. Verzichtet man auf die getrennte Gewinnung von Harn und Kot, also auf

einen operativen Eingriff, so vermag man natürlich auch die Exkremente in einem Beutel aufzufangen; es ist jedoch erforderlich, zwecks besserer Fixierung des Beutels, daß der zweite Drahtring, natürlich ohne einen Beutel daran zu befestigen, an den ersten Drahtring angelötet wird, um als Stütze zu dienen.

Die Fäzes lassen sich bei Hühnern sehr leicht, z. B. mittelst Kohlenstaubes, abgrenzen.[1]) Die Aufenthaltsdauer der Contenta im Magendarmkanal ist eine außerordentlich kurze. Bei reiner Kartoffelfütterung erscheint z. B. der zum abgegrenzten Futter gehörige Kot bereits nach ca. 1½ Stunden, nach Fütterung von Kartoffeln und Hafer bzw. Kartoffeln und Roggen und auch bei reiner Körnerfütterung nach ca. 2½ Stunden. Was den Nährstoffbedarf der Hühner anbelangt, so ist es mir gelungen, erwachsene Hähne mit 1 *g* verdaulichem Rohprotein ($N \times 6{\cdot}25$) und 80 Rohkalorien resp. 60 Reinkalorien pro Kilogramm Lebendgewicht in das

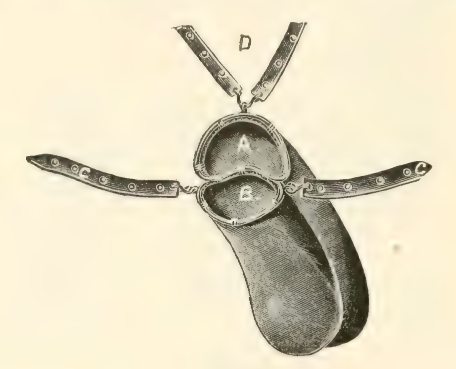


Fig. 295.

N-Gleichgewicht zu bringen und bei unverändertem Körpergewicht kurze Zeit im Käfig bei Zimmertemperatur zu erhalten, l. c.[1])

Bezüglich der Vorbereitung des Futters, der Vorfütterung, der Bestimmung der Verdauungskoeffizienten, der Aufbewahrung von Kot und Harn für die Analysen etc. haben dieselben Gesichtspunkte Gültigkeit, welche ich in den Abschnitten über Stoffwechselversuche an Hunden bzw. Wiederkäuern dargelegt habe. Bei der Gewinnung von Vogelharn ergibt

[1]) Allerdings ist die Abgrenzung besonders dann keine sehr scharfe, wenn rohfaserreiches Futter verabreicht wird; es bleiben nämlich gewisse Mengen an Futterresten im Magen und in den Blinddärmen hinter der zur Abgrenzung benutzten Substanz zurück. Aus diesem Grunde ist es ratsam, nicht zu kurze (sondern mindestens 5tägige) Perioden zu wählen. Näheres siehe unter: Studien über den Stoffwechsel des Haushuhns etc. Unter Mitwirkung von *G. Yakuwa*, von *W. Völtz*, Landwirtschaftliche Jahrbücher, Bd. 38. S. 553—592 (1909).

sich übrigens eine Komplikation insofern, als die Hauptmenge des Stickstoffes in fester Form als Harnsäure ausgeschieden wird. Man hat also den festen Harn und den flüssigen Harn gesondert zu analysieren, wenn man zu exakten Resultaten gelangen will. Eine gleichmäßige Durchmischung ist nach meinen Erfahrungen nur schwer möglich. Beiläufig will ich noch bemerken, daß ich bei Verabreichung der genannten Futtermittel an Hähne ziemlich konstant dasselbe Verhältnis von Harnstickstoff in fester Form zu solchem in gelöster Form gefunden habe, es waren nämlich zirka 65% des Stickstoffs ungelöst, ca. 35% gelöst. Ohne quantitative Trennung von Fäzes und Harn ist es, wie hervorgehoben, nicht möglich, den verdaulichen Anteil der einzelnen Nährstoffe auch nur annähernd genau zu bestimmen. Ist ein operativer Eingriff, welcher genaue Resultate erzielen läßt, aus irgend einem Grunde nicht durchführbar, so kann ich nur empfehlen, sowohl im Futter als in den quantitativ gesammelten Exkrementen N- und Kaloriengehalt zu bestimmen. Wenn auf diese Weise auch nicht der resorbierbare Anteil der einzelnen Nährstoffe zu ermitteln ist, so gelangt man doch zu genauen Daten über den durch die verschiedenen Futtermittel bewirkten N-Ansatz und über den Gehalt derselben an nutzbaren Kalorien.

# Untersuchungen an Seetieren.

Von **M. Henze**, Neapel.

Seitdem man die Notwendigkeit der Anwendung exakter chemischer Methoden in der physiologischen Chemie erkannte, hat dieses Forschungsgebiet sich mehr und mehr ausgedehnt. Trotzdem ist es auffällig, wie geringe Beachtung auch von chemischer Seite dem weiten Gebiete der Physiologie der niederen Tiere noch heute geschenkt wird, auf dem selbst die allernächst liegenden Fragen der chemischen Bearbeitung harren, ganz abgesehen davon, daß gerade die niederen Organismen in vielen Fällen weit geeignetere Objekte für das Studium allgemein biologischer Probleme sind. — Was auf genanntem Gebiete bisher geleistet wurde, hat *v. Fürth* [1]) in verdienstvoller Weise zusammengestellt, wodurch eine leichte Orientierung über die recht zerstreut liegenden Tatsachen ermöglicht wird. Viele, speziell der älteren Beobachtungen können wir nur als tastende Vorversuche bezeichnen, und dies um so nachdrücklicher, je schärfer die Anforderungen exakter chemischer Beweisführung gestellt werden.

Wenn im folgenden der Versuch gemacht wurde, eine Zusammenstellung der bisher beim Arbeiten mit niederen, und zwar speziell mit Wassertieren benutzten Methoden und Erfahrungen zu liefern, so folgt aus dem soeben Gesagten von selbst, wie wenig darin geboten werden kann.

In bezug auf rein chemische Arbeitsmethoden sind besondere Angaben kaum zu machen. Des öfteren erschweren die Kleinheit der Organe oder die geringen Blut- und Körperflüssigkeitsmengen die chemische Bearbeitung. Methodisch neue Verhältnisse und Schwierigkeiten treten jedoch auf, sowie es sich um die Anstellung von Stoffwechselversuchen handelt. Zum größten Teil sind diese Schwierigkeiten durch das Medium bedingt, in dem die Tiere leben. Man denke z. B. nur an die Aufsammlung von Stoffwechselprodukten, die, falls sie an das Seewasser abgegeben werden, aus einer 3—4%igen Salzlösung zu isolieren sind. Oder man denke an die Bestimmung der Einnahmen. Nicht nur wird es selten möglich sein, den Tieren eine z. B. abgewogene Menge einer bestimmt zusammengesetzten

---

[1]) *O. v. Fürth,* Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere. G. Fischer, Jena 1903.

Nahrung beizubringen, ja vielfach wird es überhaupt nicht gelingen, die Tiere in der Gefangenschaft zum Fressen zu bringen. Man muß sich also auf Tiere beschränken, bei denen diese Schwierigkeiten zu umgehen sind, besser aber vorerst allgemeinere Fragestellungen wählen. Es wird später noch auf diesen Punkt zurückzukommen sein.

I. TEIL.

# Methodik der Stoffwechseluntersuchungen an Wassertieren.

## A. Respiratorischer Gaswechsel.

Die Wassertiere benutzen zu ihrer Atmung den im Wasser gelösten Sauerstoff und geben andrerseits die gebildete Kohlensäure an dieses ab. Bei Ermittlung des Respirationskoeffizienten handelt es sich also in erster Linie um die exakte Bestimmung dieser Gase im Wasser. Der Gehalt der drei in natürlichen Wässern gelösten Gase, Sauerstoff, Kohlensäure und Stickstoff, die theoretisch nach Maßgabe von Absorptionskoeffizient und Partialdruck gelöst sein sollten, ist mehr oder minder großen Schwankungen unterworfen. Eine ungefähre Vorstellung erhält man aus folgenden zwei Angaben:

Nach *Joylet* und *Regnard*[1]) enthielt das Wasser der Seine pro Liter:

6—9·7 *cm*³ O; 14·3—18·1 *cm*³ N; 11·1—28·0 *cm*³ $CO_2$.

Das Meerwasser aus dem Golf von Neapel gibt nach *Vernon*[2]) pro Liter:

5·75—5·81 *cm*³ O; 12·86—12·90 *cm*³ N; 46·88—46·91 *cm*³ $CO_2$.

Dasselbe Wasser liefert, sobald es einige Zeit in den Bassins der zoologischen Station zirkuliert hat, pro Liter:

3·28—5·74 *cm*³ O; 11·76—12·03 *cm*³ N; 65·79—74·29 *cm*³ $CO_2$.

Auf die Faktoren, welche diese Schwankungen bedingen, soll später noch eingegangen werden.

Die Bestimmung der drei genannten Gase geschieht nach folgenden Methoden:

### a) Bestimmung des Sauerstoffs.

Eine der bequemsten und deshalb gerade für Stoffwechselversuche am geeignetsten Methode ist

1. die titrimetrische Sauerstoffbestimmung im Wasser nach *L. W. Winkler.*[3])

---

[1]) *Joylet* et *Regnard,* Recherches physiologiques sur la respiration des animaux aquatiques. Arch. de Physiol. II. série. T. **4**. p. 44—62 et 584—633 (1877).

[2]) *Vernon,* The respiratory exchange of lower marine invertebrates. Journ. of Physiol. Vol. **19**. p. 18—70 (1896).

[3]) *L. W. Winkler,* Die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffs. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Bd. **21**. S. 2843 (1888) und Bd. **22**. S. 1764 (1889).

Das Verfahren liefert außerordentlich exakte Resultate und erlaubt noch so geringe Sauerstoffunterschiede festzustellen, wie dies auf gasanalytischem Wege nicht möglich ist.

Prinzip der Methode.

Zu einer abgemessenen Menge des zu prüfenden Wassers wird ein Überschuß von Manganchlorid und Natronlauge gegeben, wodurch das entstandene Manganohydrat nach Maßgabe des vorhandenen Sauerstoffs zu Manganihydrat oxydiert wird. Wird hierauf der Flüssigkeit Jodkalium und Salzsäure zugesetzt, so scheidet sich eine dem gelösten Sauerstoff äquivalente Menge Jod aus, die mit Natriumthiosulfat gemessen werden kann.

$$2\,Mn\,Cl_2 + 4\,Na\,OH = 4\,Na\,Cl + 2\,Mn(OH)_2$$
$$2\,Mn(OH)_2 + O + H_2\,O = 2\,Mn(OH)_3$$
$$2\,Mn(OH)_3 + 6\,H\,Cl = 2\,Mn\,Cl_3 + 6\,H_2\,O$$
$$2\,Mn\,Cl_3 + 2\,KJ = 2\,Mn\,Cl_2 + 2\,K\,Cl + J_2.$$

Erforderliche Reagenzien:

1. Eine Lösung, enthaltend: 10 *g* Jodkalium und ca. 33 *g* Natriumhydrat in 100 $cm^3$ Wasser. Die Lösung darf nach Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure und Zusatz von Stärkelösung keine Bläuung zeigen, muß also nitritfrei sein. Eventuell empfiehlt es sich, das Natriumhydrat aus metallischem Natrium zu bereiten.

2. Eine Lösung von 40 *g* Manganochlorid (eisenfrei) in 100 $cm^3$ Wasser. Sie wird zweckmäßig mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuert, um der bei längerem Stehen erfolgenden Abscheidung von Manganihydroxyden vorzubeugen.

3. Rauchende Salzsäure.

4. Eine $\frac{n}{100}$ Natriumthiosulfatlösung (2·48 *g* $Na_2\,S_2\,O_3 . 5\,H_2\,O$ pro *l*). Dieselbe muß einige Zeit gestanden haben, ehe man endgültig den Titer gegen $\frac{n}{100}$ Jodlösung oder $\frac{n}{100}$ Bichromatlösung einstellt. Die Lösung wird ferner dunkel aufbewahrt und der Titer öfters kontrolliert. Vgl. darüber: *Treadwell*, Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie. Bd. 2. S. 447 u. 450.

5. Stärkelösung.

Ausführung der Bestimmung.

Man benutzt ca. 250 $cm^3$ fassende, mit gut eingeschliffenem Glasstopfen versehene Flaschen, deren Inhalt genau ermittelt ist. Nachdem die Flasche zunächst mit dem zu untersuchenden Wasser ausgespült worden ist, wird sie mittelst eines bis zum Boden reichenden Hebers gefüllt, und zwar läßt man eine Portion des Wassers überlaufen. Man bringt nunmehr mit einer bis zum Boden der Flasche geführten Pipette ca. 1 $cm^3$ der Lösung I und in gleicher Weise 1 $cm^3$ der Lösung II ein.[1]) Hierauf wird so-

[1]) Für karbonatreiche Wässer, speziell Seewasser, muß von Lösung I etwas mehr, etwa 2 $cm^3$, zugesetzt werden. Vgl. auch: *H. Winterstein*, Bemerkungen über die

gleich der Stopfen aufgesetzt, und zwar so, daß keine Luftbläschen eingeschlossen werden, die Flasche mehrmals gut umgeschwenkt und einige Zeit ruhig hingestellt. Man schüttle nicht zu heftig. Der Niederschlag wird sonst zu fein verteilt und senkt sich namentlich bei Seewasser nur sehr langsam. Hat sich der Niederschlag abgesetzt, so läßt man ca. 3 $cm^3$ konzentrierte Salzsäure einfließen, schließt die Flasche und schüttelt um, bis sich alles klar gelöst hat. Dann wird der Inhalt unter Nachspülen mit destilliertem Wasser in einen passenden Erlenmeyerkolben gegeben und die ausgeschiedene Jodmenge unter Stärkezusatz mit $\frac{n}{100}$ Thiosulfatlösung gemessen.

Der minimale Fehler, der im Volumen des abgemessenen Wasserquantums durch den Zusatz der Reagenzien bedingt wird, ist in den meisten Fällen zu vernachlässigen. Anderenfalls müssen die zugesetzten Kubikzentimeter Reagens genau abgemessen und bei der Berechnung vom angewandten Wasserquantum subtrahiert werden.

Berechnung:

$$1\ cm^3\ \frac{n}{100}\ \text{Thiosulfatlösung} = 0{\cdot}0798\ mg\ \text{Sauerstoff}$$

$$\text{oder} = 0{\cdot}055825\ cm^3\ \text{,, } 0^0 \text{ und } 760\ mm.$$

Korrektion bei verunreinigten Wässern:

Wässer, welche salpetrige Säure oder organische Verunreinigungen enthalten, können mit den bei diesem Verfahren verwandten Reagenzien selbst in Reaktion treten, weshalb von *Winkler* in solchen Fällen die folgende Modifikation vorgeschlagen worden ist. Dieselbe ist stets anzuwenden, falls im Liter mehr als 0·1 *mg* salpetrige Säure vorhanden ist. Desgleichen wird man sich bei Stoffwechselversuchen an Tieren, die das Wasser in irgend einer Weise verunreinigen, stets vergewissern müssen, daß man keinen auf diesem Umstand beruhenden Fehler begeht. Bei sehr starker Verunreinigung ist die vorliegende Methode eventuell gar nicht anwendbar. Vgl. unten: Titrimetrische Sauerstoffbestimmungen nach *Schützenberger* und *Risler*.

Ein abgemessenes Volumen des verunreinigten Wassers wird mit Manganichlorid versetzt und gemessen, wieviel von dem wirkungsfähigen Chlor verschwindet. Zur Bereitung der Manganichloridlösung werden 5 bis 10 Tropfen der obigen Manganochloridlösung in 500 $cm^3$ Wasser gegeben, mit 33%iger Natronlauge alkalisch gemacht und der entstandene Niederschlag wieder durch konzentrierte Salzsäure in Lösung gebracht.

Je 100 $cm^3$ dieser Manganichloridlösung werden einmal zu 100 $cm^3$ des verunreinigten Wassers, das andere Mal zu 100 $cm^3$ destillierten Wassers gegeben. Man wartet 2—3 Minuten und setzt zu beiden Proben Jodkalium, worauf das freie Jod wie oben mit Thiosulfat gemessen wird. Aus der

---

im dunkel gehaltenen Seewasser auftretenden Änderungen des Sauerstoffgehaltes. Biochemische Zeitschr. Bd. **19**. S. 427 (1909).

Differenz der in beiden Fällen verbrauchten Kubikzentimeter Thiosulfatlösung ergibt sich der Wert der Korrektion pro 100 *cm*³ Wasser.

Die eigentliche Sauerstofftitrierung erfolgt in genau der oben geschilderten Weise, nur benutzt man eine Natronlauge ohne Jodkalium. Man verwendet etwas mehr Salzsäure zum Ansäuern und fügt erst, nachdem man 2—3 Minuten gewartet hat, das Jodkalium zu.

2. Die titrimetrische Sauerstoffbestimmung nach *Schützenberger* und *Risler:*

Diese Methode (vgl. *Tiemann* und *Gärtner*[1]) wird wegen ihrer größeren Umständlichkeit dem *Winkler*schen Verfahren im allgemeinen nicht vorgezogen werden. Tritt jedoch der Fall ein, daß die auf ihren Sauerstoffgehalt zu analysierenden Wässer sehr stark mit organischen Stoffen beladen sind oder lassen sich die betreffenden Wässer von kleinen Organismen, die darin geatmet haben, nicht befreien[2]), so wird man die vorliegende Methode anwenden. Der Fehler, der bei der *Winkler*schen Methode dadurch bedingt wird, daß die organischen Substanzen mit den Reagenzien in Reaktion treten (vgl. oben), ist bei dem *Schützenberger*schen Verfahren ausgeschlossen.

Prinzip der Methode.

Der im Wasser gelöste Sauerstoff wird an eine im Überschuß zugesetzte Lösung von indigweißdisulfonsaurem Natrium übertragen und dieses dadurch in einer dem Sauerstoff äquivalenten Menge in indigdisulfonsaures Natrium verwandelt, welches blau gefärbt ist. Letzteres wird mittelst einer alkalischen Lösung von Natriumhydrosulfit, deren Titer bekannt ist, gemessen. Der Farbenumschlag von blau in gelblich zeigt das Ende der Umsetzung an.

Folgende Gleichungen veranschaulichen den Vorgang:

$$C_{16} H_{10} N_2 O_2 (SO_3 Na)_2 + O = C_{16} H_8 N_2 O_2 (SO_3 Na)_2 + H_2 O$$
$$C_{16} H_8 N_2 O_2 (SO_3 Na)_2 + H_2 = C_{16} H_{10} N_2 O_2 (SO_3 Na)_2.$$

Zur Bestimmung des Wirkungsgrades der Hydrosulfitlösung dient eine ammoniakalische Kupferoxydlösung. Nach der Gleichung:

$$2 Cu O + H_2 = Cu_2 O + H_2 O$$

entspricht somit diejenige Menge von Natriumhydrosulfitlösung einem Atom Sauerstoff, welche 2 Moleküle Kupferoxyd zu 1 Molekül Kupferoxydul reduziert.

Da die Natriumhydrosulfitlösung, abgesehen von ihrer leichten Oxydierbarkeit, bei längerem Aufbewahren einer spontanen Zersetzung in schwefligsaures und schwefelsaures Natrium unterliegt, muß der Titer öfters kontrolliert werden.

---

[1]) *Tiemann* und *Gärtner*, Handbuch der Untersuchungen und Beurteilung der Wässer. 4. Aufl. (1895).

[2]) *O. Warburg*, Über die Oxydationen im Ei. II. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **60**. S. 443 (1909).

Eine Vorstellung über die Schnelligkeit, mit der sich der Titer der Lösung ändert, gibt nachstehendes Beispiel. (Ich verdanke diese Notiz Herrn *O. Warburg*.)

31. März 1909. (Frisch bereitete Lösung)

| | | |
|---|---|---|
| | 25 $cm^3$ der Kupferlösung entsprachen | 29·00 $cm^3$ Hydrosulfitlösung |
| 1. April 1909. | 25 $cm^3$ „ „ „ | 30·70 $cm^3$ „ |
| 3. „ 1909. | 25 $cm^3$ „ „ „ | 33·10 $cm^3$ „ |
| 12. „ 1909. | 25 $cm^3$ „ „ „ | 55·00 $cm^3$ „ |

Die Lösung ist jetzt als unbrauchbar zu verwerfen.

NB. Die Kupferlösung war so stark, daß 1 $cm^3$ = 0·10 $cm^3$ O entsprachen.

## Erforderliche Reagenzien:

### 1. Lösung von indigblaudisulfonsaurem Natrium.

100 *g* indigblaudisulfonsaures Natrium (Indigotin) werden mit Wasser angerieben und in 2 *l* Wasser gelöst. Die Lösung wird filtriert und so stark gemacht, daß ein und demselben Volumen der Hydrosulfitlösung ungefähr dasselbe Volumen von Indigolösung resp. Kupferoxydlösung entsprechen. Zur weiteren Orientierung diene die Angabe, daß von einer Lösung, die 5 *g* reines Indigotin im Liter enthält, 1 $cm^3$ annähernd 0·1 $cm^3$ O entspricht.

### 2. Lösung von Natriumhydrosulfit.

Eine käufliche Lösung von Natriumbisulfit wird durch Zusatz von Wasser auf das spez. Gew. 1·25 gebracht und in einer Flasche 5—10 Minuten mit Zinkstaub geschüttelt. Zu starker Erhitzung der Flüssigkeit beugt man durch zeitweiliges Einstellen der Flasche in kaltes Wasser vor. Nach dem Erkalten wird mit dem 10fachen Volumen ausgekochten Wassers verdünnt, schnell von dem Bodensatz abgegossen und in einer gut schließenden Flasche mit soviel Kalkmilch versetzt, bis die über dem Niederschlag stehende klare Flüssigkeit deutlich alkalische Reaktion angenommen hat. Der Luftsauerstoff ist möglichst auszuschließen, weshalb die Größe der Flasche so gewählt werden muß, daß sie von der Flüssigkeit nahezu angefüllt wird. Bevor die Flüssigkeit in die Vorratsflasche der Bürette gefüllt wird, wird von dem aus überschüssigem Kalkoxydhydrat, Zinkhydroxyd und Calciumsulfit bestehenden Niederschlag durch ein Faltenfilter abgegossen und die Flüssigkeit eventuell noch mit ausgekochtem Wasser verdünnt. Die in der Lösung außer dem Hydrosulfit vorhandenen Salze verursachen keine Störung, weder bei der Titration noch bei der Einstellung des Titers mit der Kupferlösung.

Neuerdings ist reines Natriumhydrosulfit im Handel zu haben. Steht dieses zur Verfügung, so löst man 3—3·5 *g* des Salzes in 1500 $cm^3$ ausgekochtem Wasser und fügt 30 $cm^3$ $\frac{n}{1}$ Natronlauge zu. 1 $cm^3$ der Lösung entspricht so ungefähr 0·1 $cm^3$ O.

Während der Ausführung der eigentlichen O-Bestimmung (siehe unten) ist besonderes Gewicht auf die Innehaltung eines ganz bestimmten Alkalinitätsgrades zu legen, was bisher zweifellos zu wenig Beachtung gefunden hat; wenigstens erklären sich so manche ungünstige Urteile, die der Methode nachgesagt worden sind. — Am besten arbeitet man in einer Lösung, die Natriumkarbonat und Natriumbikarbonat enthält, wodurch kleine Verschiebungen der Reaktion am einfachsten geregelt werden. Bei der

Titration in Meerwasser sind diese Bedingungen von selbst gegeben. Arbeitet man dagegen beispielsweise mit künstlichem Seewasser, das alkalisch oder sauer gemacht worden ist, so dürften die folgenden Angaben von Nutzen sein[1]):

Einer neutralen Salzlösung sind pro 220 *cm*³ 0·5 *cm*³ $Na_2CO_3$-Lösung (Gramm-Mol. pro Liter) und 0·5 *cm*³ $NaHCO_3$-Lösung (Gramm-Mol. pro Liter) vor der Titration zuzusetzen. Sind die zu titrierenden Lösungen dagegen sauer oder alkalisch, so muß man den Zusatz der beiden Karbonatlösungen so regeln, daß möglichst annähernd wieder diese obengenannten Konzentrationen erreicht werden.

3. Ammoniakalische Kupferlösung.

Man geht von reinem, lufttrockenem Kupfersulfat aus. Von dem Salz ($CuSO_4$ + 5 aq.) werden 4·469 *g* in ca. 100 *cm*³ ausgekochtem Wasser aufgelöst, diese Flüssigkeit mit Ammoniak im Überschuß versetzt und die so erhaltene tiefblaue Flüssigkeit auf genau 1 *l* mit ausgekochtem Wasser aufgefüllt.

10 *cm*³ dieser Lösung geben bei der Reduktion zu Kupferoxydulsalz 0·0014336 *g* oder 1 *cm*³ Sauerstoff (0° und 760 *mm*) ab.

## Apparat zur Titration des Sauerstoffs.

Eine dreifach tubulierte Flasche trägt in der einen Tubulatur den Heber *a*, das Thermometer *b* und das von einem Wasserstoffapparat kommende Gaszuleitungsrohr *c*. Letzteres muß in dem Stopfen auf- und abwärts zu verschieben sein. Das aus dem *Kipp*schen Apparat kommende reine Wasserstoffgas wird am besten mit einer alkalischen Pyrogallollösung gewaschen. In die zweite Tubulatur ist der bis zum Boden der *Woulff*schen Flasche reichende, mindestens 250 *cm*³ fassende Tropftrichter *T* eingesetzt, aus dem die zu titrierende Wasserprobe eingelassen wird. Aus der gleichen Tubulatur führt das dicht unter dem Stopfen endende Gasableitungsrohr *d* ab. Gegen das Eindringen von Luft in die Flasche schützt die mit Wasser gefüllte, an das Gasableitungsrohr angeschlossene Waschflasche. Der zweifach durchbohrte Gummistopfen der mittleren Tubulatur trägt die beiden zu einer feinen Spitze ausgezogenen Ausflußrohre (am besten nimmt man Kapillarrohr) $b_1$ und $b_2$ der Büretten $B_1$ und $B_2$, die mit letzteren durch etwas längere Kautschukschläuche verbunden sind, so daß eine freie Bewegung der *Woulff*schen Flasche ermöglicht wird. Der Verschluß der Bürettenschläuche geschieht an Stelle der üblichen Quetschhähne mit je einem Stück kurzen, in den Schlauch eingeschobenen Stückchen Glasstab. Drückt man den Schlauch seitlich mit den Fingern zusammen, so bildet sich eine feine Rinne, durch die die Titerflüssigkeit auslaufen kann.

Bürette $B_1$ enthält die Natriumhydrosulfitlösung, und zwar wird die Bürette nach unseren im Laboratorium gesammelten Erfahrungen zweckmäßig durch den unteren seitlichen Stutzen der Bürette mittelst eines Glasrohres mit der Hydrosulfitvorratsflasche verbunden. Auf die Lösung in der Vorratsflasche wird eine Schicht Paraffinöl aufgegossen. Die beim

[1]) Dr. *Warburg*, der lange mit der *Schützenberger*schen Methode gearbeitet hat, hat mir in freundlichster Weise diese seine Erfahrungen zur Verfügung gestellt.

Füllen der Bürette in die Vorratsflasche nachdringende Luft passiert zuvor die mit alkalischer Pyrogallollösung beschickte Waschflasche *M*. Die obere Öffnung der Hydrosulfitbürette steht in luftdichter Verbindung mit einer

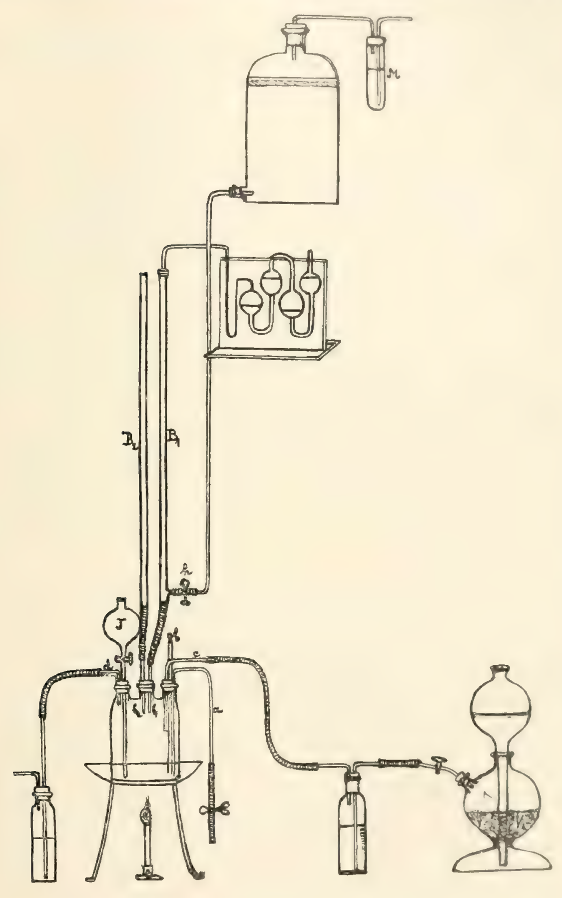



Fig. 296.

mit alkalischer Pyrogallollösung[1]) gefüllten *Hempel*schen Gaspipette. Läßt man durch Öffnen des Hahnes Natriumhydrosulfitlösung aus der Vorrats-

[1]) Eine Natriumhydrosulfitlösung erfüllt natürlich denselben Zweck.

flasche in die Bürette fließen, so wird die in der Bürette befindliche Luft in die Gaspipette gedrückt und dort schon beim ersten Male sauerstofffrei gemacht. Titriert man dann umgekehrt aus der Bürette, so wird sauerstofffreie Luft aus der Pipette nachgesaugt. Diese einfache Anordnung scheint sich sehr praktisch zu bewähren.

Da die Titrationen bei ca. 45° ausgeführt werden müssen[1], stellt man die *Woulff*sche Flasche in eine von unten angeheizte, mit Wasser gefüllte Porzellanschale.

## Titerstellung der Natriumhydrosulfitlösung.

Die Einstellung der Natriumhydrosulfitlösung, deren Titer, wie oben schon gesagt, täglich zu kontrollieren ist, erfolgt in einer ca. 200 $cm^3$ fassenden *Woulff*schen Flasche mit drei Tubulaturen. Man wähle die mittlere Tubulatur der Flasche so weit, daß der die beiden Ausflußspitzen der Büretten $B_1$ und $B_2$ tragende Gummistopfen (cf. oben) auch in diese mittlere Tubulatur paßt. Im übrigen führt in die eine der beiden anderen Tubulaturen ein Wasserstoffzuleitungs-, in die andere ein Wasserstoffableitungsrohr mit den oben beschriebenen Waschflaschen. Nachdem in die Flasche 15—20 $cm^3$ der ammoniakalischen Kupferoxydlösung von bekanntem Gehalt eingeführt sind, wird die Luft aus der Flasche durch einen lebhaften Wasserstoffstrom völlig verdrängt. Nunmehr läßt man soviel von der Natriumhydrosulfitlösung aus $B_1$ zufließen, bis die Kupferlösung nur noch schwach bläulich gefärbt erscheint, und gibt dann 2—3 Tropfen der Indigolösung aus $B_2$ zu. Die dadurch schmutzigblau erscheinende Lösung schlägt bei tropfenweisem Zusatz weiterer Sulfitlösung plötzlich scharf in ein reines Hellgelb um.

Nachdem auf diese Weise der Wirkungsgrad der Hydrosulfitlösung festgestellt ist, wird diese soweit mit ausgekochtem Wasser verdünnt, daß etwa 5 $cm^3$ derselben zur Reduktion von 10 $cm^3$ Kupferlösung verbraucht werden. Hier folge ich den Angaben *Tiemanns* und *Gärtners* bei Benutzung der selbst dargestellten Sulfitlösung. Selbstverständlich kann man bei stärkerer Verdünnung noch feinere Unterschiede in der Sauerstoffbestimmung erzielen.

Die hier beschriebene Titerstellung der Hydrosulfitlösung stammt von *Bernthsen* und gibt einen sehr scharfen Umschlag. Man kann auch den Indigozusatz als Indikator weglassen und einfach auf Entfärbung der Kupferlösung titrieren. Wenn die Hydrosulfitlösung in stärkerer Verdünnung angewandt wird, ist jedenfalls der Indigozusatz vorzuziehen.

## Ausführung der eigentlichen Sauerstoffbestimmung.

Nachdem die *Woulff*sche Flasche mit ausgekochtem Wasser angefüllt worden ist, setzt man den Wasserstoffapparat in Gang und läßt unter

[1]) Bei niederer Temperatur entzieht sich ein Teil des Sauerstoffs der Oxydation; wahrscheinlich wird er zur Bildung von Wasserstoffsuperoxyd verbraucht.

Nachtritt von Wasserstoff das Wasser bis auf ca. 250 $cm^3$ durch den Heber abfließen. Aus der Bürette läßt man hierauf eine abgemessene Menge Indigolösung (etwa 30–40 $cm^3$) einfließen und bringt die Flüssigkeit in der Flasche durch Anheizen des Wasserbades auf die Temperatur von 45°. Man setzt das Einleiten von Wasserstoff dabei fort und nähert das Zuleitungsrohr dem Flüssigkeitsspiegel bis auf wenige Millimeter. Sobald man dann sicher ist, daß alle Luft aus der Flasche verdrängt ist, läßt man soviel von der Hydrosulfitlösung zufließen, bis die blaue Farbe gerade verschwunden ist. Jetzt wird zunächst unter ganz kurzem Öffnen des Hahnes das Trichterrohr des Tropftrichters durch Ansaugen mit dem Munde gerade bis zum Hahne mit der Flüssigkeit aus der Flasche gefüllt, worauf man sich unter Umschwenken der Flasche überzeugt, daß keine Bläuung mehr erfolgt, der Sauerstoff also völlig verdrängt ist. Sollte dies nicht der Fall sein, so bewirkt man durch weiteren Zusatz einiger Tropfen Hydrosulfitlösung eine erneute Entfärbung, um nunmehr endgültig den Stand der Bürette zu notieren.

Nach diesen Vorbereitungen bringt man eine abgemessene Menge (250 $cm^3$) des zu untersuchenden Wassers[1]) durch den Tropftrichter in die Flasche, wobei man die letzten Anteile desselben durch ausgekochtes Wasser aus dem Trichterrohre verdrängt. Unter Umschütteln der Flasche läßt man jetzt soviel von der Hydrosulfitlösung zufließen, bis die blaue Flüssigkeit gerade wieder den ursprünglichen hellgelben Farbton zeigt.

Aus der Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter Natriumhydrosulfitlösung berechnet sich direkt die Menge des im untersuchten Wasser absorbierten Sauerstoffs.

* * *

Über die gasvolumetrische Sauerstoffbestimmung siehe unten.

### b) Die Bestimmung der Kohlensäure.

Bei Stoffwechsel oder Respirationsversuchen wird es sich in fast allen Fällen um die Bestimmung der Gesamtkohlensäure handeln, im allgemeinen also keine Rücksicht auf sogenannte gebundene, halbgebundene und freie Kohlensäure zu nehmen sein. Vgl. auch unter: Alkalinität des Seewassers (Anhang).

1. Titration der Kohlensäure.

Die titrimetrische Kohlensäurebestimmung läßt sich nur bei Süßwasserversuchen anwenden, und zwar auch nur aus dem Grunde, weil die zu untersuchenden Proben stets freie Kohlensäure enthalten werden. Es läuft mit anderen Worten die Ermittlung der Gesamtkohlensäure auf eine Titration der freien und halbgebundenen Kohlensäure hinaus. Für Seewasser ist die Methode unbrauchbar.

---

[1]) Nachdem man zuvor eventuell die nötigen Mengen $Na_2CO_3$ und $NaHCO_3$ in den Trichter gegeben hat (cf. oben).

Prinzip der Methode.

Die Wasserprobe wird mit Barytwasser von bestimmtem Gehalt im Überschuß versetzt und in einem aliquoten Teil der Flüssigkeit der Barytüberschuß zurücktitriert. Dem Wasser ist vor Ausführung der Titration eine gewisse Menge neutral reagierender Chlorbariumlösung zuzusetzen, damit eventuell vorhandene Alkalisalze, deren Säuren mit Barium unlösliche oder schwerlösliche Salze bilden, umgesetzt werden.

Ausführung des Versuchs:

Die Herstellung der notwendigen Titerlösungen kann in jedem Lehrbuch der Maßanalyse nachgesehen werden.

In einem auf 150 $cm^3$ geaichten Kolben werden 100 $cm^3$ des auf seinen Kohlensäuregehalt zu prüfenden Wassers mit ca. 3 $cm^3$ einer Bariumchloridlösung (1 Teil $BaCl_2 + 2$ aq auf 5 Teile Wasser) und 45 $cm^3$ titriertem Barytwasser versetzt. Man füllt mit destilliertem Wasser bis zur Marke auf, verschließt mit einem Kautschukpfropfen und schüttelt gut durch. 50 $cm^3$ der trüben Flüssigkeit (Absitzenlassen des Niederschlages ist bei nicht zu großen Niederschlagsmengen unnötig) werden hierauf mit einer Pipette abgemessen und der Barytüberschuß mit Salzsäure unter Zusatz von Phenolnaphtalëin zurücktitriert.

Berechnung:

$$1\ cm^3\ \frac{n}{10}\ HCl = 2{\cdot}2\ mg\ CO_2$$

$$= 1{\cdot}1195\ cm^3\ CO_2\ [0^0\ \text{u.}\ 760\ mm].$$

2. Bestimmung der Gesamtkohlensäure durch Auskochen.

In sehr einfacher Weise läßt sich die Kohlensäure sowohl im Süßwasser als auch im Seewasser durch Auskochen der mit verdünnter Schwefel-

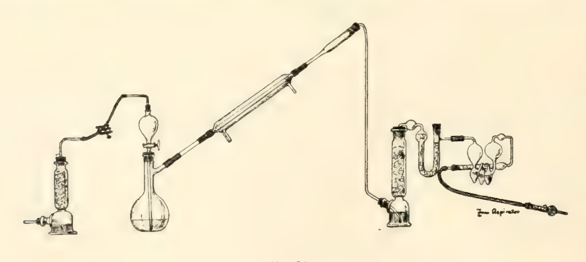


Fig. 297.

säure angesäuerten Wasserprobe bestimmen, wenn man gleichzeitig dafür Sorge trägt, daß ein kohlensäurefreier Luftstrom durch das auskochende Wasser geleitet wird. Die ausgetriebene Kohlensäure wird entweder in Natronkalkröhrchen oder einem Kaliapparat oder auch in titriertem Barytwasser aufgefangen. Den Apparat setzt man am einfachsten etwa in folgender Weise zusammen (cf. Fig. 297):

Ein Kolben von ca. 500 $cm^3$ Inhalt trägt vermittelst eines gut schließenden Kautschukstopfens einen bis zum Boden reichenden, mindestens 200 $cm^3$ fassenden Tropftrichter. Letzterer kann mit einem, ein Röhrchen enthaltenden Stopfen verschlossen werden, an welches ein mit Kalihydrat gefüllter Turm angeschlossen werden kann. Der seitliche Stutzen des Kolbens wird mit einem kurzen Kühler verbunden, dessen obere Öffnung mit einem durchbohrten Gummistopfen verschlossen ist, der ein Rohr trägt, welches in einen unten mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllten Turm taucht, der oberhalb der Einschnürung mit Schwefelsäure getränktem Bimsstein beschickt ist. Auf den Turm ist außerdem noch ein mit gekörntem Chlorcalcium gefülltes U-Rohr aufgesetzt. An dieses werden die tarierten Natronkalkröhrchen angeschlossen. Ein Aspirator oder eine Wasserstrahlpumpe können durch eine zwischengeschaltete Trockenflasche mit dem letzten Natronkalkrohr verbunden werden.

Will man die ausgetriebene Kohlensäure in titriertem Barytwasser auffangen, so sind natürlich die Trockenapparate unnötig. Das Barytwasser wird in ein Kölbchen mit doppelt durchbohrten Stopfen gegeben. Die eine Bohrung trägt das bis zum Boden der Flasche reichende, vom Kühler kommende Glasrohr, die andere ein zweckmäßiger Weise mit Glasperlen gefülltes, kurzes, weites Rohr. Die Glasperlen werden mit dem vorgelegten Barytwasser benetzt. Gegen das eventuelle Eindringen von Luft wird das Glasperlenrohr durch ein vorgelegtes Natronkalkrohr geschützt. Nach Beendigung des Versuches spült man die Glasperlen mit ausgekochtem destillierten Wasser in das Kölbchen hinein ab und titriert in diesem selbst mit $\frac{n}{10}$ Salzsäure unter Benutzung von Phenolphtalein als Indikator zurück.

Ausführung des Versuchs:

Vor Anfügen der Absorptionsgefäße saugt man zunächst $\frac{1}{2}$ Stunde $CO_2$ freie Luft durch den Apparat. Sind die Absorptionsgefäße angesetzt, so läßt man die im Trichter abgemessene Wasserprobe einfließen, der man 5—10 $cm^3$ verdünnte $H_2SO_4$ folgen läßt. Man beginnt jetzt den Kolben bei geschlossenem Trichterhahn vorsichtig zu erwärmen, so daß die Luft langsam durch den Trockenturm perlt, und steigert die Temperatur allmählich bis zum Sieden des Wassers. Jetzt erst öffnet man vorsichtig den Tropftrichterhahn und saugt langsam Luft durch den ganzen Apparat. 15—20 Minuten langes Kochen genügt, um alle Kohlensäure auszutreiben. Die Gewichtszunahme der Absorptionsröhrchen gibt direkt die im angewandten Wasser vorhandene Gesamtkohlensäure.

Ich habe es sehr zweckmäßig gefunden, ein kleines Stückchen dünnen Aluminiumdraht in den Kolben zu legen. Die Entgasung erfolgt so nicht nur schneller, sondern auch viel gleichmäßiger.

Kleine Zunahmen der $CO_2$, z. B. bei Respirationsversuchen mit kleinen Organismen, in Seewasser exakt zu ermitteln, hat seine großen Schwierigkeiten. Da das Seewasser bereits bis zu 70 $cm^3$ $CO_2$ pro Liter enthält,

ist eine Differenz von z. B. nur 0·5 *cm*³ nur schwer exakt festzustellen. *O. Warburg* hat sich durch Anwendung künstlicher, $CO_2$-freier Seewasserlösungen geholfen.

Während der Drucklegung ist eine Beschreibung der oben angeführten, speziell diesem Zwecke angepaßten Methode von *O. Warburg*[1]) publiziert worden. Es kann hier nur noch auf das Original verwiesen werden.

3. Die Kohlensäure läßt sich selbstredend auch gasvolumetrisch bestimmen, und zwar ist ein sehr handlicher Apparat zu diesem Zwecke von *Pettersson*[2]) angegeben worden. Da bei Respirationsversuchen jedoch fast immer auch gleichzeitig Sauerstoffbestimmungen erforderlich sind, vereinigt man zweckmäßig beide Bestimmungen in einer Methode, wie sie im folgenden zu beschreiben ist.

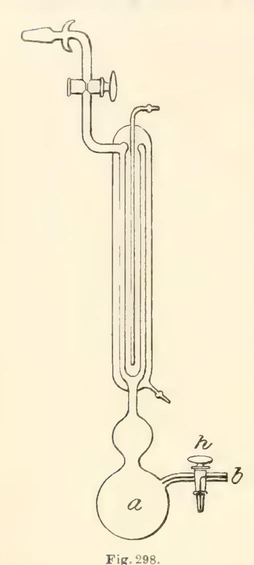


Fig. 298.

**c) Methoden der gleichzeitigen Bestimmung von Sauerstoff, Kohlensäure und Stickstoff.**

*Vernon*[3]) bediente sich bei seinen schon oben zitierten Untersuchungen zur Bestimmung der im Seewasser absorbierten Gase einer Quecksilberluftpumpe (*Pflüger*sche Pumpe). Die Pumpe stand durch einen Kühler mit einem Kolben in Verbindung. In letzteren wurden anfangs 10 *cm*³ verdünnte Schwefelsäure gegeben, worauf er unter gleichzeitiger Erwärmung luftleer gepumpt wurde. Durch einen seitlichen Ansatz des Kolbens wurde hierauf die Wasserprobe eingelassen und unter Erwärmen im Vakuum entgast. Zur Analyse des Gasgemenges diente ein *Pettersson*scher Apparat.

Diese Methode der gleichzeitigen Bestimmung aller Gase ist jedenfalls die exakteste.

Persönlich benutzen wir die sogenannte *Bohr*sche Pumpe[4]), in deren Schwefelsäuregefäß der ausgezeichnet wirkende, sogenannte *Cribb*sche Kühler eingeschliffen ist, der mit einem Kolben *a* (Fig. 298) von ca. 400 *cm*³ Inhalt verschmolzen ist. Durch den Kapillarschwanzhahn *h* werden vor Beginn des Versuchs 10 *cm*³ verdünnte Schwefelsäure eingesaugt, die zunächst ausgepumpt werden. Dann wird der Schwanzhahn sowie ein durch Gummischlauch damit verbundenes Glasrohr, welches zum Einsaugen der Wasser-

[1]) *O. Warburg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **61**. S. 261.

[2]) *O. Pettersson*, Kohlensäurebestimmungsmethode. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. **23**. S. 1402 (1890).

[3]) *Vernon*, The respiratory exchange of lower marine invertebrates. Journ. of Physiol. Vol. **19**. p. 18—70 (1896).

[4]) Vgl. *W. Nagel*, Handbuch der Physiologie des Menschen. Bd. **1**. S. 221 (1909).

probe dient, durch Ansaugen mit dem Munde von *b* aus mit dem zu untersuchenden Wasser gefüllt, worauf man eine genau abgemessene oder abgewogene Menge des Wassers (250 *cm*³) einströmen läßt. Der Kolben wird während des Auspumpens im Wasserbad auf 50—60° erwärmt. Das ausgepumpte Gasgemisch wird in eine in 0·05 *cm* geteilte Bürette überführt und in einem Haldaneapparat (cf. unten) analysiert.

Mit der Entwicklung der hydrographischen Meeresforschung hat sich das Bedürfnis geltend gemacht, eine einfache Methode der gleichzeitigen Bestimmung von O, $CO_2$ und N im Meerwasser auszuarbeiten. Eine ganze Anzahl von Apparaten sind dafür in Vorschlag gebracht worden.

Die Methoden beruhen alle darauf, die Wasserprobe unter vermindertem Druck auszukochen und das aufgesammelte Gas in zum Teil speziell dafür vorgeschlagenen Apparaten zu analysieren. Dabei hat sich gezeigt, daß es unmöglich ist, selbst beim Kochen unter vermindertem Druck und Gegenwart von Schwefelsäure, alle Kohlensäure quantitativ auszutreiben. Erst wenn die Kohlensäure gleichzeitig durch ein indifferentes Gas ausgespült wird, gelangt man zu absolut exakten Resultaten. Wie *Pettersson*[1]) zeigte, kann dies leicht durch Einbringen eines Stückchen Eisen- oder Aluminiumdrahtes in das Siedegefäß erreicht werden, wobei sich eine kleine Menge Wasserstoff entwickelt. — Durch dieses Verfahren wird leider die gleichzeitige Mitbestimmung des Stickstoffes hinfällig, die allerdings bei Stoffwechselversuchen im allgemeinen nicht in Frage kommt. Sollte dies der Fall sein, so muß die Kohlensäure nach einer der oben angegebenen Methoden für sich bestimmt werden.

*Fox* hat einen Apparat zur gleichzeitigen Bestimmung aller Gase im Seewasser konstruiert, der auch für Kohlensäure absolut exakte Werte gibt. Zur völligen Austreibung der Kohlensäure leitet *Fox* gegen Ende des Versuches aus einem an den Apparat angesetzten *Kipp*schen Apparat etwas Wasserstoff durch die Wasserprobe. Letzterer geht in die Meßbürette über und wird bei der Analyse der ausgekochten Gase wieder mit einem genau gemessenen und zugesetzten Quantum Sauerstoff verknallt und auf diese Weise entfernt. Der Apparat ist beschrieben in: Publication de circonstance, Nr. 21, Kopenhagen 1905. Urteile über den Apparat finden sich bisher nicht in der Literatur. Der Apparat scheint uns persönlich so kompliziert, daß wir darin keinen Vorzug vor der völlig exakte Resultate gebenden Quecksilberpumpe sehen können.

Für Stoffwechselversuche dürfte es, wenn größere Tiere und demnach große Kohlensäuredifferenzen in Betracht kommen, das Zweckmäßigste sein, auf die größte Genauigkeit der Kohlensäurebestimmung zu verzichten, d. h. ohne Wasserstoffentwicklung auszukochen und eventuell, wie dies aus *Ruppins*[2]) Angaben hervorgeht, 1% für die gefundene Kohlensäure hinzu zu addieren.

Der Apparat, der von uns unter diesen Verhältnissen zur gleichzeitigen Bestimmung der drei im Seewasser gelösten Gase benutzt wird,

[1]) *O. Pettersson*, Kohlensäurebestimmungsmethode. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 23. S. 1402 (1890).

[2]) *E. Ruppin*, Beitrag zur Bestimmung der im Meerwasser gelösten Gase. Wissenschaftl. Meeresuntersuch. Abt. Kiel. Neue Folge. Bd. 7. S. 137 (1903—1906).

ist dem *Knudsen*schen Apparat[1]) nachgebildet und eingehend im folgenden beschrieben:

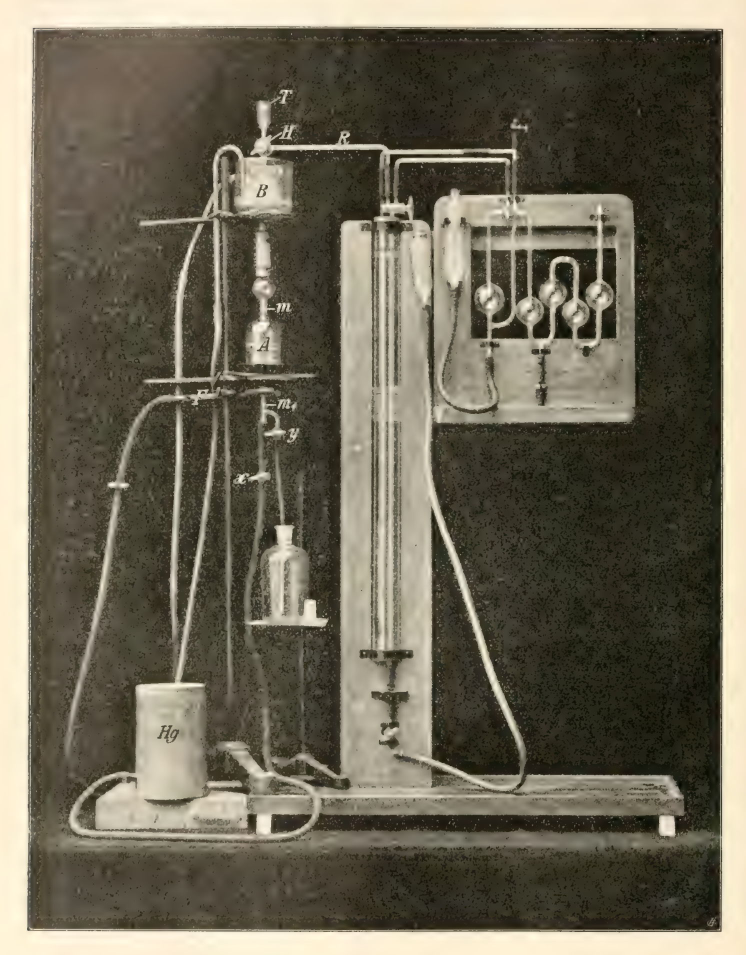



Fig. 299.

*A* ist das aus bestem Glase hergestellte Kochgefäß, welches bei *m* und $m_1$ zwei Marken hat, die den Inhalt von genau 250 $cm^3$ bezeichnen. Das Kochgefäß kann man mit einem kupfernen, unten und oben mit Asbest aus-

[1]) *M. Knudsen*, The Danisca Ingolf Expedition. Vol. **1**. Part. 1 (1899).

gekleideten Mantel umgeben (in Fig. 299 ist derselbe weggelassen[1]). Die Hitzeverteilung beim Anheizen mit dem Ringbrenner *F* wird dadurch gleichmäßiger. Mit dem Kochgefäß ist durch eine dazwischen geschaltete Kugel von ca. 50 $cm^3$ Inhalt der Kugelkühler *B* verbunden, und zwar entweder verschmolzen oder durch Vakuumschlauch luftdicht verbunden. Letzteres dürfte zweckmäßiger sein, um das Kochgefäß im Falle eines Bruches leicht auswechseln zu können. Das *A* und *B* verbindende Rohr muß hinreichend weit (mindestens 12 *mm* weit) sein, damit bei heftigem Kochen das Wasser leicht in das Kochgefäß zurücklaufen kann. Aus letzterem Grunde ist auch die Kugel zwischen *A* und *B* angebracht worden.

Der Kugelkühler *B*, der von einem zu- und ablaufendes Kühlwasser enthaltenden Gefäß umgeben ist, trägt oben einen großen, gut eingeschliffenen Dreiweghahn *H*[2]), durch den einerseits der Trichter *T*, andrerseits das feine Kapillarrohr *R* mit der Bürette verbunden werden können.

Das untere Ende des Kochgefäßes *A* läuft in ein sich gabelndes Rohr aus. An das eine Ende desselben ist durch eine vakuumdichte Kautschukverbindung der Hahn *X* angesetzt, der durch einen Schlauch die Kommunikation mit dem hölzernen Quecksilbergefäß *Hg* vermittelt. Mit dem engeren Teil des Gabelrohrs ist der Hahn *Y* verbunden, durch den mittelst eines angefügten Rohres die zu analysierende Wasserprobe eingesaugt wird. An die Kapillare *R* wird eine Gasbürette mit Dreiweghahn angesetzt, die in 0·05 $cm^3$ geteilt ist und für die ein Inhalt von 30 $cm^3$ genügt.

Zur Analyse der ausgekochten Gase empfehlen wir sehr den Apparat von *Haldane*[3]), wie er in der Figur abgebildet ist; seine Beschreibung gehört nicht mehr hierher.

Ausführung einer Bestimmung:

Man läßt etwas Quecksilber in den Apparat treten, schließt hierauf den vorher geöffneten Hahn *H* und senkt das Reservoir, wodurch eine Luftverdünnung im Apparat entsteht. Dadurch ist es möglich, das Rohr, durch welches die zu analysierende Wasserprobe eingesaugt werden soll, nach Öffnung des Hahnes *Y* mit dem zu analysierenden Wasser zu füllen. *Y* wird geschlossen. Man füllt jetzt durch Heben des Reservoirs *Hg* den ganzen Apparat mit Quecksilber, und zwar bis ans Ende der Kapillare *R* und bis in den Trichter *T*, indem man das zuvor in den Apparat eingesaugte Wasser durch den letzteren entfernt. Hahn *H* wird geschlossen und das Quecksilberreservoir bei geöffnetem Hahn *X* gesenkt. Sobald das Quecksilber die Marke $m_1$ erreicht hat, wird *X* geschlossen. Öffnet man

---

[1]) Der Kupfermantel hat auf zwei sich gegenüberliegenden Seiten je einen schlitzförmigen mit Marienglas verschlossenen Ausschnitt, um in das Innere des Gefäßes sehen zu können.

[2]) Man wählt besser das neueste Modell des sogenannten *Miescher-Geißlerschen* Dreiweghahns mit nur einem im Hahnstopfen eingeblasenen Kanal. Auf die Güte dieses Hahnes kommt selbstverständlich alles an. Die Figur zeigt einen gewöhnlichen Dreiweghahn.

[3]) *John Haldane*, Some improved methods of gasanalysis. Journ. of Physiol. Vol 22 p. 465 (1898).

jetzt *V*, so tritt das zu analysierende Wasser in das Kochgefäß ein, und zwar läßt man es bis zur Marke *m* steigen.

Ehe man den Ringbrenner anzündet, läßt man etwas Quecksilber durch *N* eintreten, so daß gerade der Boden des Kochgefäßes damit bedeckt ist. Es wird so beim späteren Einfließen des kalten Quecksilbers in das heiße Kochgefäß ein Springen desselben vermieden. Man kocht zuerst zweimal je 5—10 Minuten aus und treibt das Gas jedesmal in die Meßbürette über. Sodann läßt man ca. 5 $cm^3$ verdünnte Schwefelsäure aus dem Trichter *T* durch den Dreiweghahn einfließen, worauf man abermals zweimal ca. 5—10 Minuten kocht und jedesmal das entwickelte Gas in die Meßbürette überführt. Man kann dabei leicht verhindern, daß Wasser in die Bürette gelangt. Da schon nach den ersten beiden Auskochungen der absorbierte Sauerstoff ausgetrieben ist, so besteht keine Gefahr, daß nach Zufügung der Schwefelsäure etwa das Quecksilber oxydiert werde, was eventuell Sauerstoffverluste bedingen könnte. Sobald nach einer Auskochung das Gas übergeführt ist, und man von neuem zu evakuieren hat, ist es zweckmäßig, das Kühlwasser ablaufen zu lassen, sonst passiert es, daß, sobald ein gewisses Vakuum erreicht ist und das Wasser plötzlich zu sieden beginnt, sich der ganze Kühler mit Wasser anfüllt.

### d) Bestimmung der Kohlensäuretension des Wassers.

Für Fragen des respiratorischen Gaswechsels der Wassertiere sind nicht nur die absoluten, im Wasser gelösten Gasmengen maßgebend, sondern vor allem auch die Tension der einzelnen Gase (vgl. *Krogh*[1]), *Winterstein*[2]).

Während für Sauerstoff und Stickstoff die Tensionen leicht aus Absorptionskoeffizient und Gasgehalt des Wassers zu berechnen sind, liegen die Verhältnisse für die Kohlensäure viel komplizierter, um so mehr, wenn die betreffenden Wässer karbonat- und bikarbonathaltig sind, wie dies beim Seewasser der Fall ist (vgl. Anhang unter Alkalinität des Seewassers).

*Krogh*[1]) hat für die Ermittlung der Kohlensäuretension im Wasser nachstehend beschriebenes einfache Verfahren angegeben, das sich auf folgende Überlegung stützt.

Schüttelt man 1 *l* destilliertes Wasser bei einer Temperatur von 15·6°, bei der der Absorptionskoeffizient der Kohlensäure gleich 1 ist, mit 100 $cm^3$ kohlensäurefreier Luft, so wird die Kohlensäuretension des Wassers bloß um $^1/_{10}$ ihres ursprünglichen Wertes sinken, indem Kohlensäure an die Luft abgegeben wird. Dieser Wert wird sich noch verringern, wenn das Wasser die Kohlensäure nicht nur in Lösung, sondern zum größeren Teil in Form leicht dissoziabler Verbindungen (Calciumbikarbonat) enthält. Ex-

[1]) *A. Krogh,* On the tension of carbonic acid in natural waters and especially in the sea. Meddelelser om Grönland. Vol. **26**. p. 333—405 (1904).

[2]) *H. Winterstein,* Beiträge zur Kenntnis der Fischatmung. *Pflügers* Archiv. Bd. **125**. S. 73 (1908).

perimentelle Untersuchungen haben in der Tat gezeigt, daß sich ohne bemerkbaren Fehler die Kohlensäuretension in natürlichen Wässern in der Weise bestimmen läßt, daß man ein größeres Wasserquantum mit einem möglichst kleinen Luftquantum bis zur Erreichung des Gleichgewichtes schüttelt und dann einfach in dieser Luftprobe die Kohlensäure ermittelt.

Ausführung der Bestimmung:

Eine 1 *l* fassende Flasche (am besten Jenaer Glas) wird mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen versehen, der erstens das bis zum Boden reichende Glasrohr *a* trägt, welches am oberen Ende mit einem einfachen Glashahn verschlossen werden kann und an das gleichzeitig das Thermometer zur Messung der Wassertemperatur befestigt ist. Zweitens

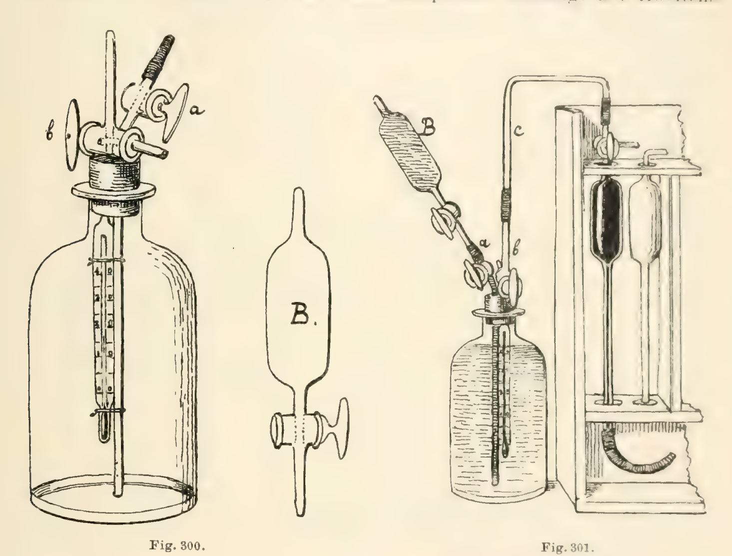



Fig. 300. Fig. 301.

ist in den Stopfen der Dreiweghahn *b* mit enger Bohrung eingesetzt, der kurz unter dem Stopfen abschneidet. An *a* läßt sich mittelst einer kurzen Schlauchverbindung der Glaskolben *B* von 15 $cm^3$ Inhalt, der seinerseits mit einem Hahn versehen ist, ansetzen.

Ist die Flasche mit der zu untersuchenden Wasserprobe gefüllt und *B* an *a* angesetzt, so wird durch Saugen an *B* das Kölbchen mit Wasser gefüllt. Alle Hähne sind dabei geöffnet und eine dem ausgetretenen Wasservolumen entsprechende Luftmenge tritt dafür ein. Jetzt wird *B* abgenommen, das Thermometer abgelesen und, nachdem alle Hähne geschlossen sind, die Flasche mindestens eine Minute heftig geschüttelt. Man öffnet den Hahn *b* einen Moment, damit sich der Druck ausgleichen kann und schüttelt

hierauf abermals eine Minute lang. Nachdem *B* wieder an *a* angesetzt ist, mit der Vorsicht, daß *a* dabei ganz mit Wasser aus *B* gefüllt wird, läßt man zunächst die etwa in *b* während des Schüttelns hineingeratenen Wassertropfen durch kurzes Öffnen der Schwanzbohrung des Hahnes austreten. Nunmehr wird *b* mit einem sehr exakten Apparat zur Bestimmung der Kohlensäure (*Krogh* benutzt den *Haldane*- oder *Pettersson*schen Apparat) verbunden und die Luftprobe zur Bestimmung ihres Kohlensäuregehaltes in den Apparat eingesaugt.

### e) Mikrochemische Gasanalyse.

Für die Bestimmung des Gasaustausches kleiner, im Wasser lebender Tiere werden sich mit Vorteil die Methoden der mikrochemischen Gasanalyse von *Barcroft* und *Hamill*[1]) und eventuell das neuerdings von *Krogh*[2, 3]) beschriebene Verfahren anwenden lassen.

Die Beschreibung dieser Methoden vergleiche S. 658 ff.

## B. Methodik der Versuchsanordnung, Respirationsapparate.

Handelt es sich um einfache Respirationsversuche an kleineren Organismen, deren Gasaustausch dementsprechend gering ist, so genügt es in den meisten Fällen, die Tiere in einem der Größe ihres Sauerstoffkonsums entsprechenden, abgeschlossenen Wasserquantum zu halten, sie darin eine bestimmte Zeit atmen zu lassen und den Gehalt des Wassers an Sauerstoff und Kohlensäure vor und nach dem Versuche zu ermitteln.

Als Gefäße können hierzu gut eingeschliffene Stöpselflaschen verwendet werden, die man in einem Thermostaten hält und eventuell darin auf einer Drehscheibe langsam bewegt (cf. z. B. *Warburg*[4]).

### a) Vernons Versuchsanordnung.

*Vernon*[5]), der sich fast als einziger mit dem Studium des Gaswechsels von niederen, speziell pelagischen marinen Tieren befaßt hat, verfuhr methodisch in analoger Weise.

Das Respirationsgefäß *R* (Fig. 303) besteht aus einer unten und oben tubulierten Glasglocke von ca. 700—1500 $cm^3$ Inhalt mit aufgeschliffener Glasplatte. Die obere Tubulatur trägt außer dem Thermometer ein gewöhnlich mit

---

[1]) *J. Barcroft* and *R. Hamill*, The estimation of the oxygen dissolved in salt solutions. Journ. of Physiol. Vol. **34**. p. 306—314 (1906).

[2]) *A. Krogh*, Some new methods for the tonometric determination of gastensions in fluids. Skand. Arch. f. Physiol. Bd. **20**. S. 259 (1907/08).

[3]) *A. Krogh*, On micro-analysis of gases. Skand. Arch. f. Physiol. S. 279.

[4]) *O. Warburg*, Beobachtungen über die Oxydationsprozesse im Seeigelei. Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. **57**. S. 1—16 (1908).

[5]) *Vernon*, The respiratory exchange of lower marine invertebrates. Journ. of Physiol. Vol. **19**. p. 18—70 (1896).

einem Quetschhahn geschlossenes Rohr *b*. Eine zweite Tubulatur am unteren Rande der Glocke dient zum Einsatz eines schlangenförmig gewundenen Rohres, das, oben als **T**-Rohr endend, einmal zum Zulassen von frischem Seewasser aus dem Rezipienten *V*, andrerseits zum Abhebern von Wasserproben aus der Respirationskammer zu Zwecken der Analyse bestimmt ist. In letzterem Falle ist gleichzeitig Rohr *b* zu öffnen. Das untere Ende des Schlangenrohres wird, besonders wenn sehr zarte Organismen zur Untersuchung kommen, von zwei Uhrgläsern umfaßt, damit der zu- oder abfließende Wasserstrom die Tiere nicht lädiert. Das Respirationsgefäß steht in einem großen, als Thermostat dienenden Seewasserbehälter, durch den nach Belieben verschieden temperiertes Wasser geleitet werden kann. Beim Durchgang durch das oben erwähnte Schlangenrohr wird das aus der Vorratsflasche *V* kommende Wasser annähernd auf die Temperatur des Thermostaten gebracht.

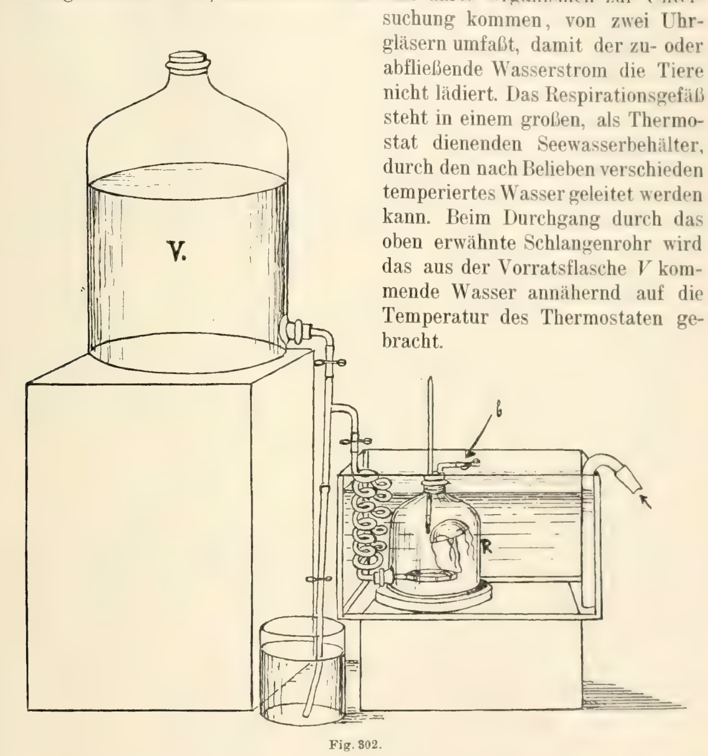



Fig. 302.

Sobald das Versuchstier in das Respirationsgefäß gebracht ist, verdrängt man das darin befindliche Wasser durch solches aus dem Rezipienten *V*. Das Tier bleibt 2—3 Stunden in dem durch die Glocke abgeschlossenen Wasserquantum, wobei die Temperatur beobachtet wird. Nach Ablauf dieser Zeit wird die zur Analyse nötige Wasserprobe (300 $cm^3$) unter Verwerfung der ersten aus dem Schlangenrohre stammenden Anteile abgelassen.

### b) Versuchsanordnung von Pütter.

Bei seinen Untersuchungen über den Stoffwechsel des Blutegels bediente sich *Pütter*[1]) des nachstehenden Verfahrens:

Das Stoffwechselgefäß besteht aus einer *Woulff*schen Flasche von 1 *l* Inhalt. Zwei der Hälse tragen eingeschliffene Glashähne, von denen der eine bis zum Boden der Flasche, der andere eben nur in das Gefäß reichen. In den dritten Hals ist ein Manometer eingesetzt. Vor Einbringen der Tiere werden ca. 60 $cm^3$ Leitungswasser in das Gefäß gegeben und, nachdem einige Zeit kohlensäurefreie Luft durch den ganzen Rezipienten geleitet worden ist, werden die Hähne abgeschlossen. Jetzt wird das Manometer abgelesen und gleichzeitig Temperatur und Barometerstand notiert. Aus dem Manometerstand am Ende des Versuches und aus der daraus zu berechnenden Volumdifferenz des Luftraumes gegen Beginn des Experiments wird, unter Berücksichtigung der wie nachstehend direkt bestimmten Kohlensäure, der Sauerstoffverbrauch berechnet. — Die produzierte Kohlensäure erfährt man, indem man das Gefäß 1—2 Stunden mit einem kohlensäurefreien Luftstrom ausspült und die Kohlensäure in tarierten Natronkalkröhrchen zurückhält.

Länger fortgesetzte Respirations- oder Stoffwechselversuche, speziell an größeren Tieren, machen es notwendig, daß der dem Wasser entzogene Sauerstoff erneut und die ausgeschiedene Kohlensäure entfernt werden. Zurzeit sind nachstehend beschriebene Versuchsanordnungen und Apparate dafür in Vorschlag gebracht worden. Nach Ansicht des Verfassers bedürfen dieselben noch vielfach der Verbesserung, da Fehlerquellen infolge Kompliziertheit der Anordnung nicht zu vermeiden sind.

### c) Respirationsapparat von Joylet und Regnard.

*Joylet* und *Regnard*[2]), denen wir die ersten eingehenderen Untersuchungen über die Respiration der Fische verdanken, konstruierten einen Respirationsapparat, dem das Prinzip des Apparates von *Regnault* und *Reiset* für Landtiere zugrunde gelegt wurde. Der Apparat dürfte durch die beiden unten beschriebenen Respirationsapparate von *Bounhiol* und *Zuntz* überholt sein, so daß er in seiner ursprünglichen Form kaum noch Anwendung finden wird, hier also nicht beschrieben werden soll.

### d) Respirationsapparat von Bounhiol.

*Bounhiol*[3]) hat für seine Untersuchungen über die Atmung der Fische einen im Prinzip dem *Joylet-Regnard*schen Apparat nachgebildeten Respi-

[1]) *A. Pütter,* Der Stoffwechsel des Blutegels (Hirudo medicinalis). Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. **6**. S. 217—286 (1906/1907) und Bd. **7**. S. 16—61 (1907/1908).

[2]) *Joylet* et *Regnard,* Sur une nouvelle méthode pour l'étude de la respiration des animaux aquatiques. Compt. rend. de l'Acad. T. **84**. p. 1060 (1877).

[3]) *J. P. Bounhiol,* Recherches expérimentales sur la respiration aquatique. II. La respiration des poissons marins dans ses rapports avec la captivité et la pisciculture. Bull. scient. de la France et de la Belgique. T. **39**. p. 227—305 (1905).

rationsapparat konstruiert, der sich durch seine verhältnismäßige Einfachheit auszeichnet.

Der Rezipient $C$ (vgl. Fig. 303), der der Größe des jeweilig untersuchten Tieres angepaßt ist, enthält eine bekannte Menge Wasser und wird nach Einbringen des gewogenen Tieres durch einen gut paraffinierten Stopfen verschlossen, der außer dem Thermometer von den vier Röhren $c_1, c_2, c_3, c_4$ durchsetzt wird. Rohr $c_1$ führt die von der Pumpe $A\,B$ kommende Luft zum Fischbehälter zurück, und, um diese möglichst zu verteilen, endet das Rohr in drei trichterförmig erweiterte Zweige, über deren Öffnungen Seidenstoff gebunden wird.

Durch Rohr $c_2$ kommuniziert die Luft über dem Wasser im Rezipienten mit dem Druckregulator $D\,D'$.

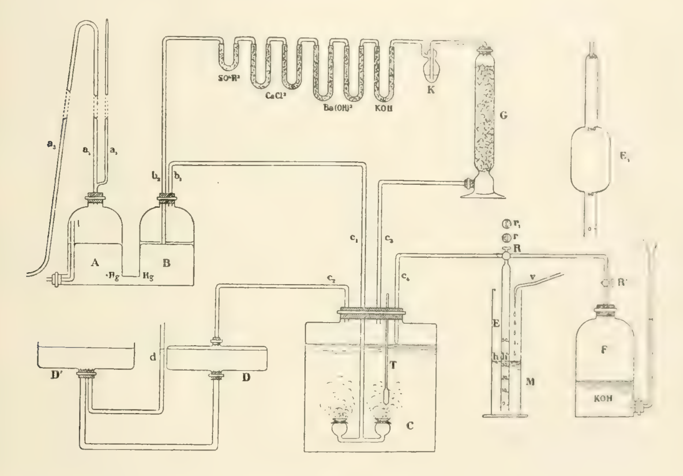



Fig. 303.

Rohr $c_3$ führt die aus dem Wasser austretende Luft, um sie von Kohlensäure zu befreien, zunächst zu dem Trockenturm $G$ und dann zu einer Reihe von Absorptionsapparaten. Zwischen den letzteren und $G$ ist vorsichtshalber noch eine als Ventil dienende Waschflasche $k$ mit konzentrierter Schwefelsäure eingeschaltet.

Die in den Absorptionsapparaten kohlensäurefrei gemachte Luft gelangt zur Pumpe $A\,B$ und wird von dieser wieder durch das Wasser in den Rezipienten zurückgedrückt.

Das Rohr $c_4$, dessen zur Spitze ausgezogenes Ende die Wasseroberfläche berührt, steht in Verbindung mit dem mit Sauerstoff gefüllten, graduierten Rohr $E$, dessen Dreiweghahn $R$ überdies eine Verbindung mit dem Sauerstoff-Vorratsgasometer $F$ ermöglicht. Der Sauerstoff strömt

automatisch in den Rezipienten nach, sobald durch Verbrauch dieses Gases der Druck in dem letzteren sinkt. Durch Nachtropfen von Wasser aus der feinen Öffnung *v* wird der Wasserstand innerhalb und außerhalb des Sauerstoffrohres gleich hoch gehalten.

Die Stelle einer Pumpe vertritt eine einfache Einrichtung, die ohne alle Hähne, Stopfbüchsen und Schmiermittel arbeitet. Die beiden Flaschen *A B*, die durch ihre unteren Tubulaturen in Verbindung stehen, sind teilweise mit Quecksilber gefüllt, das in Flasche *B* zur Verhinderung der Oxydation mit einer Schwefelsäureschicht bedeckt ist. Das Gefäß *A* kann durch das Rohr *t* aus einem hochgelegenen Reservoir mit Wasser gefüllt werden. Sein Hals ist mit einem Kautschukstopfen verschlossen, der den Heber $a_1 a_3$ trägt. Sobald das durch *t* eintretende Wasser bis zum höchsten Punkt des Hebers gelangt ist, entleert sich *A* spontan, und zwar unter Nachtritt von Luft aus dem zu einer feinen Spitze ausgezogenen Rohre $a_2$. Das Lumen des Heberrohres muß bedeutend weiter sein als das des Zuflußrohres *t*. Die Entleerung von *A* würde demnach sehr schnell erfolgen; sie läßt sich jedoch regulieren durch mehr oder weniger weites Öffnen des Rohrendes $a_2$. Zur Verhinderung einer möglichen selbsttätigen Entleerung des Gefäßes *A* bei eventuell sehr langsam erfolgendem Wasserzufluß aus *t* muß der Durchmesser des absteigenden Heberschenkels $a_3$ bedeutend geringer sein als der des aufsteigenden Schenkels $a_1$.

Sobald nun das Wasser im Heber steigt, steigt auch das Quecksilber in *B* und preßt die darüber stehende Luft auf dem Wege durch $b_1$ durch das Wasser des Rezipienten *C*. Entleert sich dagegen der Heber, so sinkt das Quecksilber in *B* und saugt Luft an durch das Rohr $b_2$.

Die Einschaltung irgend welcher Gefäße mit Flüssigkeiten, die der zirkulierende Luftstrom durchperlen müßte, sind vermieden, wodurch ein sofortiger Druckausgleich im ganzen System erfolgen kann, sobald die Pumpvorrichtung unterbrochen wird.

Es bleibt noch die Funktion des Druckregulators *D D'* zu beschreiben: Sobald durch Eintritt von Luft aus $c_1$ der Druck in *C* steigen würde, sucht die über dem Wasser stehende Luft das Niveau des Wassers in *D* herabzudrücken. Haben nun die beiden Gefäße *D D'* recht beträchtliche Durchmesser, so werden so geringe Druckdifferenzen, wie sie im vorstehenden Falle vorkommen können, Niveaudifferenzen zwischen den Wasseroberflächen in *D* und *D'* praktisch nicht bedingen und der Druck in *D* sowohl als in *C* wird dem von *D'*, d. h. dem der Atmosphäre gleich sein.

Ausführung eines Versuches: Vor Beginn des Versuchs wird das Gesamtvolumen des im Apparat eingeschlossenen Luftvolumens bestimmt. Von diesem werden dann die Volumina des Wassers, der Schwefelsäure und des Versuchstieres abgezogen. Sobald das Tier eingesetzt ist, wird der Apparat geschlossen und alle Kautschukverbindungen auf das sorgfältigste geprüft und verkittet. Man liest Temperatur und Barometerstand ab und öffnet den Wasserzufluß für *t*.

Hierauf wird je eine Analyse der Luft und des in *C* eingeschlossenen Wassers in bezug auf O und $CO_2$-Gehalt gemacht.

Die gleichen Analysen werden wiederholt nach Beendigung des Versuches, und zwar wiederum unter Berücksichtigung von Temperatur und Druck.

Zur Analyse der im Wasser enthaltenen Gase bediente sich *Bounhiol* der Methode des Auskochens im Vakuum unter Anwendung einer Quecksilber-Luftpumpe.

## e) Respirationsapparat nach Zuntz.

Der größte und komplizierteste Respirationsapparat, wie ihn *Zuntz*[1] und seine Schüler zu Untersuchungen über den Stoffwechsel der Fische benutzen, ist in Fig. 304 abgebildet. Leider läßt sich aus der Literatur kaum ersehen, inwieweit sich der Apparat bewährt hat.

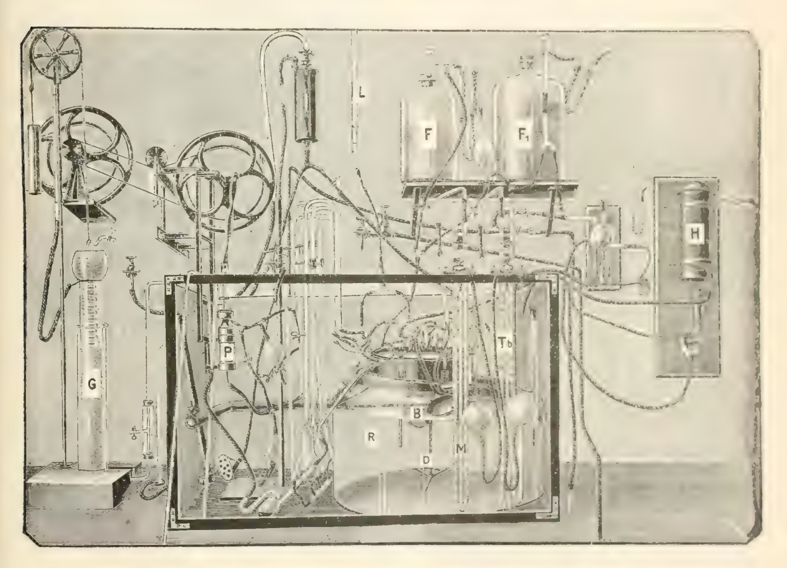



Fig. 304.

Der Rezipient *R* zur Aufnahme der Fische und des Wassers besteht aus einem zirka 52 *l* fassenden zylindrischen Glasgefäß, dessen Öffnung mit einem die notwendigen Tubulaturen tragenden vernickelten Metalldeckel verschlossen wird.

Zur Ventilation des Wassers dient die doppeltwirkende Pumpe *P*, die mit einem $^1/_{16}$ H. P.-Elektromotor angetrieben wird. Sowohl die von ihr ausgesaugte als auch die von ihr in das Wasser durch das Dreiwegrohr *D*

[1]) *N. Zuntz,* Ein Respirationsapparat für Wassertiere. Archiv für Physiol. 1901. Verh. der Physiol. Ges. Berlin. S. 543.

wieder eingepreßte Luft passiert je ein Paar Kaliventile (*Müller*sche Ventile), in denen sie von Kohlensäure befreit wird.

Der durch die Versuchstiere zur Atmung verbrauchte Sauerstoff wird aus einem Gasometer *G* ersetzt und strömt durch ein Quecksilberventil nach, sobald der Druck im Rezipienten *R* unter eine bestimmte einstellbare Grenze sinkt. Der Druck im Gasometer wird durch eine zuerst von *Pflüger* angegebene Regulationsvorrichtung konstant erhalten.

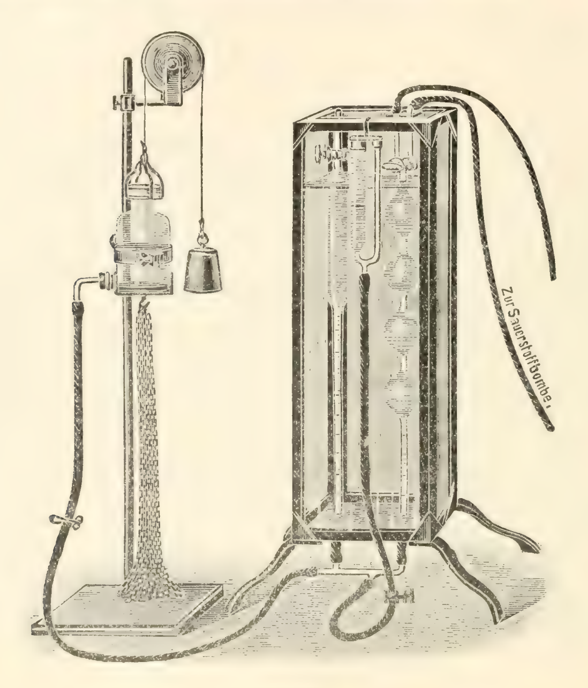



Fig. 305.

Später ist ein anderer Apparat zu diesem Zwecke, d. h. zur selbsttätigen Sauerstoffzufuhr von *Zuntz* konstruiert worden, der in Fig. 305 abgebildet ist.

Er besteht aus einer mit vier Kugeln versehenen Meßbürette, die 400 $cm^3$ faßt und die mit einem Thermobarometer kommuniziert. Bürette und Barometer stehen in einem Wasserbehälter. Der nötige Gasdruck wird durch eine mit der Meßröhre verbundene und mit ganz verdünnter Kalilauge beschickte Flasche erzielt. Das Gewicht der Flasche selbst wird durch ein Gegengewicht ausgeglichen. Die an der Flasche hängende Kette soll,

wenn die Kalilauge bei Druckverminderungen im Respirationsapparat nachläßt und Sauerstoff überdrückt, das sich vermindernde Gewicht der Flasche kompensieren.

Zur exakten Messung der Druckverhältnisse in dem Respirationsgefäß dienen zwei Manometer. Manometer *M* gibt den tatsächlichen Druck in *R* an. Zur Korrektion dieses Druckes, der sowohl von Temperatur und atmosphärischem Barometerstand als auch von dem Sauerstoffkonsum der Fische abhängig ist, dient ein sogenanntes Thermobarometer *Th*. Dieses steht in Kommunikation mit einem abgeschlossenen Luftvolumen, welches sich unter denselben Bedingungen von Druck und Temperatur befindet wie die Luft in *R*. Die Ablesungen an diesem Thermobarometer während eines Versuches liefern den Korrektionsfaktor zur Reduktion der Ablesungen von *M* auf Druck und Temperatur zu Beginn des Versuches.

Zur Regulation der Temperatur stehen die genannten Apparate, wie aus der Figur ersichtlich, in einem großen Thermostaten, dessen Wasser ständig durchmischt wird, und zwar durch Einblasen von Luft mittelst einer Wasserstrahlpumpe. Die eigentliche Temperaturregulation erfolgt durch ein auf drei Seiten des Thermostaten entlang laufendes Kupferrohr, welches mit absolutem Alkohol gefüllt ist und sich in ein Bleirohr fortsetzt. Dies letztere steht außerhalb des Wassers mit einem Quecksilber enthaltenden U-Rohr in Verbindung. Der Alkohol schließt direkt an das Quecksilber an. Dehnt sich der erstere aus, so wird das Quecksilber emporgedrückt und reguliert dadurch den Gaszufluß unter dem Heizapparat *H* resp. erlaubt nur der Zündflamme noch zu brennen. Durch den Heizapparat läuft ein konstanter Wasserstrom in den Thermostaten, der selbst einen Überlauf hat. Auf diese Weise konnte die Temperatur in den zwischen 30—40° liegenden Grenzen gehalten werden. Will man auf eine niedere Temperatur einstellen, so passiert der Wasserstrom, ehe er in den Heizapparat eintritt, zunächst eine Kühlschlange, die von Eis umgeben ist. Zur Füllung und Reinigung der Kaliventile stehen dieselben mit den beiden Flaschen *F* und $F_1$ in Verbindung, von denen die eine mit 12%iger Kalilauge, die andere mit ausgekochtem destilliertem Wasser gefüllt ist.

Will man während eines Versuches Proben von Wasser oder Luft entnehmen, so würde sich natürlich der Druck im ganzen Apparat ändern. Zu diesem Zwecke ist der dünnwandige Kautschukballon *B* in den Deckel des Respirationsgefäßes eingesetzt. Sobald man eine Luftprobe entnimmt, füllt man in diesen Ballon soviel Wasser, daß der ursprüngliche Druck wieder hergestellt wird, was sich durch Ablesen des Manometers *M* kontrollieren läßt.

Bei Anstellung eines Versuches wird das Respirationsgefäß bis zum Überlaufen mit Wasser gefüllt, die Tiere werden gewogen und hineingesetzt und der Deckel aufgeschraubt. Dann werden 5—6 *l* Wasser zum Zwecke der Gasanalysen abgelassen etc., wofür reine Luft durch das Rohr *L* eintritt.

### f) Versuchsanordnung mit Durchlüftung nach Pütter.

Für länger dauernde Stoffwechselversuche an niederen Meeresorganismen hat auch *Pütter*[1]) eine Versuchsanordnung beschrieben:

Als Rezipient dient ein 5—8 *l* fassendes Gefäß, auf welches eine Glasglocke aufgeschliffen ist, die durch einen eisernen Bügel mittelst zweier Schrauben fest aufgepreßt werden kann (vgl. Fig. 306). Die Glasglocke selbst hat eine Bohrung, in die ein Kautschukpfropfen mit drei Löchern eingepaßt ist. Eines derselben trägt ein zu einer Spitze ausgezogenes Glasrohr, das fast den Boden des Gefäßes berührt und zur Zuleitung der Luft

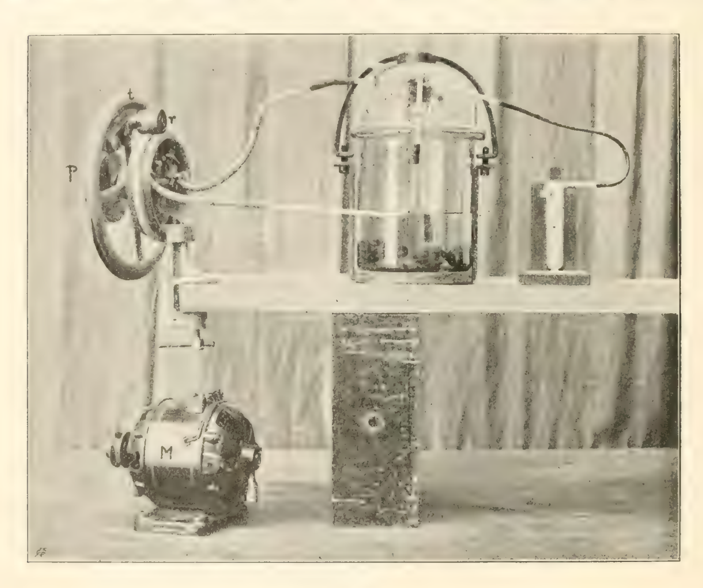



Fig. 306.

dient. In der zweiten Bohrung des Stopfens sitzt ein eben nur in die Glocke hineinragendes Rohr zur Ableitung der Luft. Die dritte Bohrung trägt ein Manometer zur Kontrollierung des Druckes. *Pütter* beschickte diese Gefäße[2]) für einen Versuch mit einer gewissen Gewichtsmenge von Tieren und ca. einem Liter künstlichem Seewasser. Zur Durchlüftung wurde

[1]) *A. Pütter*, Studien zur vergleichenden Physiologie des Stoffwechsels. Abhandl. der kgl. Ges. der Wissensch. zu Göttingen. Math.-phys. Kl. Neue Folge. VI. Nr. 1 (1908).

[2]) Solche Gefäße werden von den Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf (Berlin) zum Verschicken von Seetieren angefertigt.

das über dem Wasser stehende Luftvolumen kontinuierlich, resp. in Zeitintervallen von einigen Stunden, durch das Wasser gedruckt, wozu die von *Prytz* konstruierte Schlauchpumpe [1]) benutzt wurde.

Dieser äußerst sinnreiche Apparat *P* (vgl. Fig. 306) besteht in einem um einen flachen Zylinder gelegten, mit Hanfeinlage versehenen Schlauch, gegen den die Rolle *r* preßt, deren Achse selbst an dem Triebrad *t* befestigt ist. Wird das Triebrad durch die Hand oder einen Motor *M* in Bewegung gesetzt, so rollt die an den Schlauch fest angedrückte Rolle über denselben, indem sie gleichzeitig die in den Schlauch eingeschlossene Luft vor sich herdrückt. Sobald also die beiden Enden des Pumpenschlauches in richtiger Weise mit den beiden Röhren des Stoffwechselgefäßes verbunden sind, wird das über dem Wasser stehende Luftvolumen kontinuierlich durch dasselbe gedrückt. Die Wirkung eines Ventils kommt dadurch zustande, daß die Rolle in einem gewissen Zeitpunkte beide Schläuche gleichzeitig zudrückt.

Das Manometer des Respirationsgefäßes sollte ursprünglich zu genauen Volumenbestimmungen dienen, wie dies bei der unter b) beschriebenen Versuchsanordnung auseinandergesetzt wurde. Angeblich soll sich jedoch die Diffusion durch den Schlauch als zu groß erwiesen haben. Um daher keine gasförmigen Stoffwechselprodukte zu verlieren, stellte *Pütter* von vornherein etwas Unterdruck im ganzen Apparat her unter der Annahme, daß auf diese Weise höchstens 50—100 $cm^3$ Luft während eines Versuches eingesogen würden, deren Kohlensäuregehalt für seine Versuche keinen Fehler bedeutete.[2])

Zur Konstanterhaltung der Temperatur wurde das Stoffwechselgefäß in eine sogenannte Kochkiste gesetzt. Kam Tageslichtbeleuchtung in Betracht, so wurden die Rezipienten in den großen Aquariumbassins gehalten; handelte es sich dagegen um konstante Beleuchtung, so wurde das ganze Zimmer verdunkelt und das Stoffwechselgefäß direkt mit einer Glühlampe beleuchtet.

Über die Analyse der Stoffwechselprodukte nach Beendigung des Versuches vgl. das Kapitel: Bestimmung der Ausscheidungsprodukte.

### g) Mikrorespirometer nach Thunberg.

Es soll nicht unterlassen werden, hier auch auf das Mikrorespirometer hinzuweisen, welches von *Thunberg*[3]) speziell für Respirationsversuche an kleinen Landwirbellosen konstruiert wurde. Dasselbe scheint sich, namentlich zu orientierenden Versuchen, auch für Wassertiere verwenden zu lassen. (Vgl. *Trendelenburg.*[4]))

Die Beschreibung des Apparates findet sich S. 664.

---

[1]) Die Pumpe ist zu beziehen von R. Fueß, Steglitz b. Berlin.

[2]) Über den dabei eingesogenen Sauerstoff äußert sich *Pütter* nicht.

[3]) *T. Thunberg*, Ein Mikrorespirometer. Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 17. S. 74 (1905).

[4]) *Trendelenburg*, Versuch über den Gaswechsel bei Symbiose zwischen Alge und Tier. Arch. f. Anat. u. Physiol. Physiol. Abtlg. S. 42—70 (1909).

### C. Bestimmung der Ausscheidungsprodukte.

Die Aufsammlung und Bestimmung der von Wassertieren im Stoffwechsel ausgeschiedenen Stoffe gehört mit zu den schwierigsten Aufgaben, abgesehen vielleicht von den Ausgaben gasförmiger Natur, deren Bestimmungen zum größten Teil bereits besprochen wurden. Mit Ausnahme einiger später zu erwähnenden Notizen findet sich in der Literatur überhaupt keine Angabe über die Methodik der direkten Aufsammlung der im Harn oder Kot abgegebenen Substanzen. Ferner muß bei dieser Gelegenheit daran erinnert werden, daß die Exkretion bei vielen Vertretern der niederen Tierreihe nicht nur auf den Darm oder Ureter beschränkt ist. Wir wissen, daß die Exkretionsprodukte den Körper vielfach auch durch die Hautoberfläche verlassen. Man vergleiche z. B. die Kapitel über Exkretion in dem schon zitierten Buche von *v. Fürth.*[1]) Unter solchen Umständen ist man auf jeden Fall gezwungen, die besagten Produkte aus dem Wasser zu isolieren, in dem die Tiere gelebt haben. Zu einer allgemeinen Orientierung wird es jedoch immer möglich sein, aus dem Stickstoff- und Kohlenstoffgehalt des Wassers vor und nach dem Versuche Schlüsse auf die Größe des Stoffumsatzes zu ziehen. In dieser Weise verfuhr z. B. *Knauthe*[2]) bei Fischen, nachdem er vergebens versucht hatte, den abgegebenen Kot in Beuteln, die den Tieren umgebunden wurden, aufzufangen (cf. *Knauthe*)

*Pütter*[3]) betont in seinen Studien zur vergleichenden Physiologie des Stoffwechsels, daß es zunächst weniger darauf ankomme, die Ausscheidung eines bestimmten Stoffes zu verfolgen, als vielmehr allgemeine Angaben zur Orientierung zu sammeln. Er versuchte so festzustellen, in welchem Verhältnisse die einzelnen Hauptgruppen der Nahrungsstoffe, Proteine, Kohlehydrate, Fette, umgesetzt werden und andrerseits, in welchem Umfange dabei Prozesse beteiligt sind, die unter die Kategorie der Hydrolysen, Spaltungen und Oxydationen fallen.

Da hier nicht der Platz ist, auf theoretische und kritische Erörterungen einzugehen, muß auf die betreffenden Arbeiten verwiesen werden.

Nach den bisherigen Erfahrungen gestaltet sich die Bestimmung der an das Wasser abgegebenen Ausscheidungsprodukte praktisch ungefähr folgendermaßen:

**a) Feste Bestandteile.** Manche Tiere sondern beträchtliche Schleimmengen ab, die nach *Pütter* bei Aufstellung einer Bilanz nicht zu vernachlässigen sind. *Pütter* filtriert dieselben auf einem aschefreien Filter ab und kalkuliert aus dem im Filterrückstand nach *Kjeldahl* ermittelten N-Gehalt ihre Menge.

---

[1]) *O. v. Fürth,* Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere. G. Fischer, Jena 1903.

[2]) *K. Knauthe,* Zur Kenntnis des Stoffwechsels der Fische. *Pflügers* Arch. Bd. **73**. S. 490 (1898/99).

[3]) *A. Pütter,* Studien zur vergleichenden Physiologie des Stoffwechsels. Abhandl. der kgl. Ges. der Wissensch. zu Göttingen. Math.-phys. Kl. Neue Folge. VI. Nr. 1 (1908).

Das Filtrat wäre weiter zu untersuchen auf gelöste Bestandteile, und zwar handelt es sich hierbei, soweit Angaben vorliegen, um:

**b) Bestimmung des Kohlenstoffs, welcher gelösten organischen Substanzen entspricht.** Für die Größe der Kohlenstoffausscheidung gibt erstens die in Respirationsversuchen ermittelte Kohlensäuremenge ein Maß, zweitens aber auch die Kohlensäure, welche bei Verbrennung derjenigen organischen Substanzen gebildet wird, die von den Tieren an das Wasser abgegeben werden.

Nach *Pütters*[1 u. 2]) Ansicht kommen gelöste organische Kohlenstoffverbindungen in solcher Menge im Meerwasser vor, daß er zum größten Teil auf Grund dieser Ansicht eine völlig neue Anschauung über die Ernährungsphysiologie der niederen Meerestiere entwickelt hat. Verf.[3]) erlaubt sich in dieser Hinsicht auf seine Kritik in *Pflügers* Archiv zu verweisen. Auf jeden Fall bleibt die Ermittlung der im Stoffwechsel ausgeschiedenen und an das Wasser abgegebenen Verbindungen ein wichtiges Erfordernis. *Pütter* hat sich hierfür des *Messinger*schen Verfahrens bedient, wie es zu analogen Zwecken schon früher benutzt worden ist.[4])

Der bekannten Methode liegt das nachstehende Prinzip zugrunde:

Die organische Substanz wird durch ein Gemisch von Chromsäure und konzentrierter Schwefelsäure völlig zu Wasser und Kohlensäure oxydiert, und aus der Menge der letzteren ein Rückschluß auf die Menge der organischen Substanz gemacht. Selbstredend bestimmt man im vorliegenden Falle auch die vom Wasser gebundene und absorbierte Kohlensäure, die für sich ermittelt und von der Gesamtkohlensäure subtrahiert werden muß.

Das Verfahren kompliziert sich etwas, wenn dasselbe in Seewasser zur Anwendung kommen soll. Bei Zufügung der Reagenzien werden hierbei beträchtliche Mengen von Salzsäure, Chlor und Chromoxychlorid in Freiheit gesetzt, die natürlich nicht in die Absorptionsapparate kommen dürfen. Im folgenden wird die Beschreibung des Verfahrens für Seewasser wiedergegeben, wie es Verfasser[3]) angegeben hat. Handelt es sich um Bestimmungen in Süßwasser, so sind die zur Zurückhaltung des Chlors bestimmten Waschflaschen einfach wegzulassen.

Der Apparat (Fig. 307) besteht aus einem ca. $^3/_4$ *l* fassenden Kolben *K* mit am besten eingeschliffenem Trichterrohr, das die nötigen Hähne *a* und *b* hat. Der seitliche Stutzen des Kolbens ist mit einem aufsteigenden, etwas

---

[1]) *A. Pütter,* Studien zur vergleichenden Physiologie des Stoffwechsels. Abhandl. der kgl. Ges. der Wissensch. zu Göttingen. Math.-phys. Kl. Neue Folge. VI. Nr. 1 (1908).

[2]) *A. Pütter,* Die Ernährung der Wassertiere. Zeitschr. f. allgem. Physiologie. Bd. 7. S. 283—320 (1907/1908).

[3]) *M. Henze,* Bemerkungen zu den Anschauungen *Pütters* über den Gehalt des Meeres an gelösten organischen Kohlenstoffverbindungen und deren Bedeutung für den Stoffhaushalt des Meeres. *Pflügers* Arch. Bd. **123**. S. 487 (1908). Vgl. auch die kürzlich erschienene Arbeit von *E. Raben,* Ist organisch gebundener Kohlenstoff in nennenswerter Menge im Meerwasser vorhanden? Wissensch. Meeresuntersuch. Abt. Kiel. Neue Folge. Bd. **11**. S. 111 (1909).

[4]) Vgl. *Tiemann* und *Gärtner,* Handbuch, pag. 258.

Glaswolle enthaltenden Kühlrohr verbunden, an das sich eine mit destilliertem Wasser und Glasperlen beschickte Waschflasche *A* anschließt. Auf letztere folgt ein Trockenturm *B*, abwechselnd gefüllt mit grob gepulvertem Antimon und Glaswolle, von dem die Leitung zu einem ca. 40 *cm* langen Verbrennungsrohr führt. Dasselbe enthält ein Gemisch von Bleichromat und Kupferoxyd und wird vor Beginn des Versuches angeheizt. Zur Kontrolle, ob alles Chlor quantitativ zurückgehalten wird, ist an das Ende des Verbrennungsrohres ein Röhrchen *R* angeschaltet, in welchem ein Streifen von angefeuchtetem Jodkaliumstärkepapier liegt. Zum Trocknen der Gase dienen der Trockenturm *C*, der unten konzentrierte Schwefelsäure, oben mit Schwefelsäure getränkten Bimsstein enthält, außerdem trägt der Turm ein mit Chlorcalcium gefülltes **U**-Rohr. Die Kohlensäure wird in den beiden tarierten Natronkalkröhrchen *D* und *E* zurückgehalten. Um durch den ganzen Apparat einen kohlensäurefreien Luftstrom leiten zu können, ist an das letzte Natronkalkrohr durch eine Schutzwaschflasche eine Saugpumpe angeschlossen,

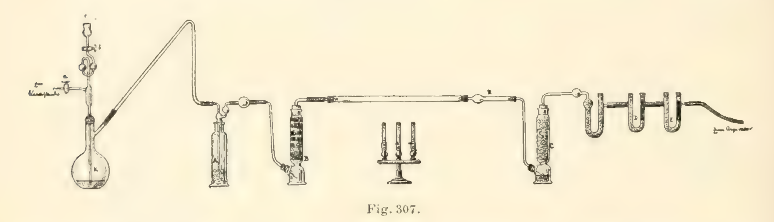


Fig. 307.

andrerseits steht mit dem Zersetzungskolben durch den abschließbaren Hahn *a* ein Kalihydrat enthaltender Waschapparat in Verbindung.

Erforderliche Reagenzien: An Stelle des gewöhnlich benutzten Kaliumbichromats habe ich Chromsäure gewählt, um die Menge der Salze im Zersetzungskolben nicht noch mehr zu erhöhen.

Die Reagenzien müssen absolut kohlenstofffrei sein, wovon man sich durch blinde Versuche überzeugen muß. Am besten stellt man sich dieselben unter Benutzung einer Angabe von *W. Hempel*[1]) wie folgt dar:

Man löst unter Erwärmung 300 *g* Kaliumbichromat in 500 $cm^3$ Wasser unter Zusatz von 420 $cm^3$ konzentrierter Schwefelsäure, läßt 12 Stunden stehen und saugt von dem in großer Menge auskristallisierten sauren schwefelsauren Kalium ab. Man benutzt dazu eine saubere Nutsche, selbstredend ohne Filtereinlage, und wäscht zuletzt mit einigen Kubikzentimetern destilliertem Wasser nach.

Das Filtrat wird auf 80—90° erwärmt und mit 150 $cm^3$ konzentrierter Schwefelsäure und soviel Wasser versetzt, bis die anfangs ausgeschiedenen roten Flocken von Chromsäure wieder gelöst sind. Dann wird bis zur Bildung einer Kristallhaut eingeengt, 12 Stunden stehen gelassen und die

[1]) *W. Hempel*, Gasanalytische Methoden. 3. Aufl., pag. 413 (1900).

auskristallisierte Chromsäure auf einem Filter mit Platinkonus abgesaugt. Die Mutterlauge wird vorsichtig ein zweites Mal konzentriert und kristallisieren gelassen.

Man erhitze nicht zu hoch, da sonst unter Sauerstoffentwicklung eine Zersetzung zu Chromoxyd erfolgt. Der Zutritt von Staub muß bei allen Manipulationen peinlichst ausgeschlossen werden.

Die Schwefelsäure wird vorbereitet, indem man 1 *l* konzentrierter Schwefelsäure mit etwa 10 *g* Chromsäure 1 Stunde lang auf dem Sandbade erhitzt und nach Beseitigung der Flamme etwa 5 Minuten Luft hindurch bläst, um eventuell gebildete Kohlensäure zu entfernen.

Ausführung einer Bestimmung: Nachdem der Apparat durch halbstündiges Ausspülen mit einem $CO_2$-freien Luftstrom vorbereitet und das Verbrennungsrohr angeheizt ist, wird eine Wasserprobe von 200 *cm*³ in den Kolben gegeben. Gleichzeitig fügt man ca. 5 *g* $CrO_3$ zu. Während man einen langsamen Luftstrom durch den ganzen Apparat saugt, läßt man 50 *cm*³ $H_2SO_4$ vorsichtig zufließen und mischt nach und nach durch leichtes Umschwenken des Kolbens. Erst nach Verlauf von ca. 20 Minuten beginnt man mit kleiner Flamme, die ganz allmählich vergrößert wird, zu erhitzen, und hält schließlich mindestens 15 Minuten im schwachen Sieden. Unter Luftdurchleitung läßt man dann ganz allmählich erkalten. Bei Versuchen in Seewasser darf die Verbrennung nicht zu bald abgebrochen werden. Um ganz sicher zu gehen, sind zirka 2 Stunden für die ganze Bestimmung erforderlich (vgl. *Henze*).

**c) Bestimmung der stickstoffhaltigen Verbindungen.** Der Stickstoffgehalt der an das Wasser in löslicher Form abgegebenen organischen stickstoffhaltigen Verbindungen wird zusammen mit dem Ammoniak durch Einengen eines hinreichenden, zuvor angesäuerten Wasserquantums und nachfolgender Verbrennung nach *Kjeldahl* bestimmt. Bei Seewasser werden sich infolge der großen Salzmengen kaum mehr als 250 *cm*³ auf diese Weise behandeln lassen. Hinreichend exakte Erfahrungen fehlen hier noch. (Vgl. auch die oben zitierte Arbeit von *E. Raben*, S. 116 117.)

Zur Orientierung über die Verteilung des Stickstoffs lassen sich natürlich bei genügendem Material die bekannten, speziell hierfür ausgearbeiteten Methoden benutzen.

**d) Bestimmung des Ammoniaks.** Wird Ammoniak in einigermaßen nennenswerter Menge im Stoffwechsel produziert, so wird eine Wasserprobe bis etwa zur Hälfte unter Zusatz von Magnesiumoxyd[1]) abdestilliert. Das Destillat wird in titrierter Säure aufgefangen.

Handelt es sich um die Ermittlung sehr geringer Ammoniakmengen, was bei speziellen Fragestellungen der Fall sein könnte, so wird man zu einem kolorimetrischen Verfahren greifen. Am geeignetsten ist das Ver-

---

[1]) Das MgO ist vor Gebrauch 20 Minuten mit Wasser zu kochen, um es völlig $NH_3$-frei zu machen.

fahren von *Frankland* und *Armstrong*, respektive das von *Miller* modifizierte, sobald es sich um Süßwasser handelt (vgl. *Tiemann* und *Gärtner*[1]).

Prinzip des Verfahrens: Man schätzt die Menge des Ammoniaks nach der mehr oder minder intensiven Färbung, welche *Neßlers* Reagens in der Wasserprobe hervorruft. Es ist Bedingung, daß dieselbe nicht mehr als 0·1 *mg* $NH_3$ in 100 $cm^3$ enthalte. Sind größere Mengen vorhanden, so muß die Bestimmung in einem aliquoten, entsprechend verdünnten Teil der Probe vorgenommen werden.

Ausführung der Bestimmung: Man bringt 100 $cm^3$ des zu untersuchenden Wassers in einen *Hehner*schen Zylinder und fügt 1 $cm^3$ *Neßlers* Reagens zu. Die entstehende Färbung muß hell bis mittelgelb sein. Sollte sie einen roten oder dunkelroten Farbton zeigen, so muß das Wasser in einem bestimmten Verhältnis (5, 10, 20, 25 $cm^3$ zu 100 $cm^3$) verdünnt werden. Als Vergleichsflüssigkeit benutzt man eine Chlorammoniumlösung, von der 1 $cm^3$, 1 *mg* $NH_3$ entspricht.[2] Man gibt von dieser Stammlösung 1—3 $cm^3$, was durch eine Vorprobe zu ermitteln ist, in 100 $cm^3$ destilliertes, ammoniakfreies Wasser und versetzt ebenfalls mit 1 $cm^3$ *Neßlers* Reagens.

Man vergleicht die Lösungen einige Zeit nach eingetretener Reaktion und unter gleicher Temperatur.

Bereitung des *Neßler*schen Reagens: 50 *g* Jodkalium werden in 500 $cm^3$ heißem Wasser gelöst und mit einer heißen konzentrierten Sublimatlösung versetzt, bis ein bleibender roter Niederschlag entsteht, wozu 20—25 *g* Quecksilberchlorid erforderlich sind. Nachdem man filtriert hat, fügt man eine Auflösung von 150 *g* Kaliumhydrat in 300 $cm^3$ Wasser zu, verdünnt auf 1 Liter und gibt nochmals ca. 5 $cm^3$ Sublimatlösung hinzu. Von dem neuerlich entstandenen Niederschlag wird dekantiert und das Reagens gut verschlossen aufbewahrt.

Auf Seewasser läßt sich, wenn absolut exakte Resultate erwünscht sind, dieses Verfahren unmittelbar nicht übertragen (vgl. *Schürmann* in *Tiemann* und *Gärtners* Handbuch, S. 131). Die Seewasserprobe muß in diesem Falle erst über MgO abdestilliert werden, ehe die kolorimetrische Prüfung stattfinden kann.

Es sei hier speziell auf die kritische Zusammenstellung von *E. Raben*[3]) hingewiesen.

**e) Bestimmung der Nitrite.** Anhaltspunkte dafür, daß im Stoffwechsel von Wassertieren Stickstoff in Form von Nitriten zum Umsatz kommt, liegen mit Ausnahme einer Angabe von *Pütter*[4]) meines

---

[1]) *Tiemann* und *Gärtner,* Handbuch der Untersuchung und Beurteilung der Wässer. IV. Aufl.

[2]) Die Lösung bereitet man, indem man 3·147 *g* reines, bei 100° getrocknetes Chlorammonium zu 1 Liter löst.

[3]) *E. Raben,* Über quantitative Bestimmung von Stickstoffverbindungen im Meerwasser etc. Wissensch. Meeresuntersuch. Abtlg. Kiel. Bd. 8. Neue Folge. S. 81 (1903/08).

[4]) *A. Pütter,* Studien zur vergleichenden Physiologie des Stoffwechsels. Abhandl. der kgl. Ges. der Wissensch. zu Göttingen. Math.-phys. Kl. Neue Folge. VI. Nr. 1 (1908).

Wissens nicht vor. Auf jeden Fall soll auf die Ermittlung geringer Mengen hier kurz Rücksicht genommen werden, da dieselben in natürlichen Wässern wohl selten ganz fehlen. Auf Grund der Untersuchungen von *Raben*[1]) wird man am besten die Methode von *Preuße* und *Tiemann* anwenden, und zwar gleichgültig, ob in Süß- oder Meerwasser.[2])

Ausführung der Bestimmung: *Raben* (loc. cit.) beschreibt dieselbe folgendermaßen: „Um die salpetrige Säure im Meerwasser möglichst sicher und exakt nachweisen zu können, gebe ich 100 $cm^3$ des zu prüfenden Wassers in einen Destillationskolben von 200 $cm^3$ Inhalt, säure mit 2 bis 3 Tropfen 90%iger Essigsäure an und fange das Destillat in der Vorlage unter den bei der Ammoniakbestimmung angegebenen Vorsichtsmaßregeln[3]) auf; im ganzen lasse ich reichlich 30 $cm^3$, also etwa ein Drittel des zur Prüfung entnommenen Quantums Wasser abdestillieren.

Nun nehme ich ein ebensolches Kölbchen, wie es mir als Vorlage gedient, gebe reichlich 30 $cm^3$ destilliertes Wasser und ein bestimmtes Volumen einer Natriumnitritlösung hinein, welche im Kubikzentimeter $^1/_{100}$ *mg* $N_2O_3$ enthält, dann füge ich gleichzeitig zu dem Inhalt eines jeden Kölbchens 1 $cm^3$ verdünnte Schwefelsäure (1 + 3) resp. 1 $cm^3$ 90%iger Essigsäure und je 1 $cm^3$ Metaphenylendiaminlösung. 1 *g* salzsaures Metaphenylendiamin wird in 180 $cm^3$ Wasser gelöst, die Lösung durch Aufkochen mit Tierkohle entfärbt und das Filtrat mit 20 $cm^3$ verdünnter Schwefelsäure vermischt, diese Lösung ist in dunklen, gut geschlossenen Flaschen recht lange haltbar.

Das so behandelte Destillat und die Vergleichslösung lasse ich dann mehrere Stunden stehen, bevor ich eine Beobachtung vornehme, da mit der Zeit die Intensität des sich bildenden Azofarbstoffs zunimmt, ein Moment, welches besondere Beachtung erheischt, daß die Reagenzien zum Destillat wie zur Vergleichslösung gleichzeitig zugegeben werden. Also nach Verlauf von mehreren Stunden gebe ich den Inhalt der beiden Kölbchen in *Hehner*sche Zylinder, um zunächst bei Tageslicht die gröbere und bei diffusem Licht die feinere Einstellung der Farbintensitäten aufeinander vorzunehmen.“

**f) Bestimmung gasförmiger Ausscheidungsprodukte.** Es dürfte sich zeigen, daß im Stoffwechsel niederer Tiere weit mehr, als bisher zu unserer Kenntnis gelangt ist, sogenannte Gärungsprozesse, und zwar infolge intramolekularer Atmung zum Ablauf kommen. (Ich erinnere z. B. an *Weinlands* Arbeiten.) Diese Prozesse könnten die Abgabe von Wasserstoff oder Kohlenwasserstoffen, z. B. von Methan, bedingen, was sich bei der Gasanalyse der Respirationsluft resp. der Gasanalyse des Wassers zeigen müßte. Es würde in diesen Fällen der nach Absorption von O und $CO_2$ zurückbleibende und auf Stickstoff zu beziehende Gasrest unverhält-

[1]) *E. Raben*, Über quantitative Bestimmung von Stickstoffverbindungen im Meerwasser etc. Wissensch. Meeresunters. Abtlg. Kiel. Bd. 8. Neue Folge. S. 81. (1903/08.)

[2]) Für Süßwasser ist das Abdestillieren unnötig (cf. Ausführung der Bestimmung).

[3]) Verhindern, daß etwas von der Destillationsflüssigkeit überspritzt und in die Vorlage kommt.

nismäßig groß erscheinen und zu einer speziellen Prüfung Veranlassung geben. Eine exakte Gasanalyse kann hier allein Sicherheit verschaffen.

*Pütter*[1]) gibt an, bei seinen Stoffwechselarbeiten den Nachweis der Produktion von Wasserstoff und Kohlenwasserstoffen auf folgendem Wege erbracht zu haben: Er verdrängt die Luft des Respirationsraums durch einen kohlensäurefreien Luftstrom. Die austretende, durch Schwefelsäure getrocknete Luft passiert zunächst Natronkalkröhrchen, in denen die während des Versuches gebildete Kohlensäure absorbiert wird und wird dann durch ein angeheiztes und mit Kupferoxyd gefülltes Verbrennungsrohr geleitet. Hier wird aller Kohlenstoff zu Kohlensäure und aller Wasserstoff zu Wasser oxydiert und in den an das Rohr angeschlossenen Absorptionsröhrchen aufgefangen und gewogen. Auf diese Weise sollte er die Menge Kohlenstoff, die an Kohlenwasserstoffe gebunden war, erhalten. War nun die gefundene Wassermenge so groß, daß ihr Wasserstoffgehalt hinreichte, die ermittelte Kohlenstoffmenge gerade abzusättigen, so schließt *Pütter* daraus auf die Produktion von Methan. Fand sich weniger Wasser (Wasserstoff) als diesem Verhältnis entsprach, so wurde ein ungesättigter Kohlenwasserstoff angenommen; war es dagegen umgekehrt, so deutete dies nach *Pütter* auf die Anwesenheit von freiem Wasserstoff neben Kohlenwasserstoffen.

## D. Äußere Einflüsse, welche bei Stoffwechseluntersuchungen in Frage kommen.

*a)* Temperatur:

Schon *Jolyet* und *Regnard*[2]) beobachteten bei ihren Untersuchungen über die Atmung der Fische den außerordentlich großen Einfluß der Temperaturschwankungen des Wassers auf die Atemtätigkeit. Nach den Erfahrungen aller späteren Autoren — erwähnt seien nur *Vernon*[3]) und neuerdings *Winterstein*[4]), *Baglioni*[5]) und *Warburg*[6]) — findet sich auch sonst das Temperaturgesetz allgemein bestätigt.

Der schädigende Einfluß, den die Abweichungen von der mittleren Meerestemperatur, die sich, abgesehen von der Oberfläche, sehr konstant erhält, auf die Meeresorganismen bedingt, ist, nebenbei bemerkt, sehr auffällig an dem Befinden der Tiere in den großen Aquarien der Zoologischen Station zu Neapel zu verfolgen, wo Temperaturschwankungen von 9° im Winter bis zu 24° im Sommer stattfinden.

*Knauthe*[7]) hebt hervor, daß die Freßlust der Fische bei erhöhter Temperatur ganz bedeutend abnimmt. Desgleichen geht korrespondierend

---

[1]) *A. Pütter*, Studien zur vergleichenden Physiologie des Stoffwechsels. Abhandl. der kgl. Ges. der Wissensch. zu Göttingen. Math.-phys. Kl. Neue Folge VI, Nr. I.

[2]) *Jolyet* und *Regnard*, Recherches physiologiques sur la respiration des animaux aquatiques. Arch. de Physiol. II. série. T. **4**. p. 44—62 et 584—633 (1877).

[3]) *Vernon*, The respiratory exchange of lower marine intervertebrates. Journ. of Physiol. Vol. **19**. p. 18—70.

[4]) *H. Winterstein*, Beiträge zur Kenntnis der Fischatmung. *Pflügers* Archiv. S. 1—25.

[5]) *S. Baglioni*, Der Atemmechanismus der Fische. Ein Beitrag zur vergleichenden Physiologie des Atemrhythmus. Zeitschr. f. Allg. Physiol. Bd. **7**. S. 177—282 (1907).

[6]) *O. Warburg*, Beobachtungen über die Oxydationsprozesse im Seeigelei. Zeitschrift f. physiol. Chem. Bd. **57**. S. 1 (1908).

[7]) *K. Knauthe*, Zur Kenntnis des Stoffwechsels der Fische. *Pflügers* Arch. Bd. **73**. S. 490 (1898).

mit der Temperaturerhöhung ein regelmäßiges Ansteigen der Stickstoffausscheidung einher. Analoge Ergebnisse vgl. bei *Pütter.*

*b)* Licht:

Der exakte Nachweis, daß die strahlende Energie des Lichtes den Stoffwechsel ohne indirekte Wirkung durch das Nervensystem beeinflußt, scheint bisher noch nicht erbracht zu sein. Von *Pütter*[1]) wird neuerdings behauptet, daß der Schwamm Suberites im Lichte einen doppelt so großen Sauerstoffkonsum aufweist als im Dunkeln. Ein umgekehrtes Verhältnis soll bei Cucumaria zu beobachten sein.

*c)* Sauerstoffzehrung des Wassers:

In einer abgeschlossenen Wassermenge beobachtet man stetige langsame quantitative Änderungen seines Gasgehaltes. Dieselben sind bedingt durch die Gegenwart von Mikroorganismen, deren Tätigkeit durch Anwesenheit von Exkrementen, Nahrungsresten, Schleim eventuell durch Licht und andere Faktoren bedeutend gesteigert werden kann. Gerade bei Stoffwechselversuchen ist deshalb dieser sogenannten Sauerstoffzehrung die größte Beachtung zu schenken.

„Diese Prozesse können an Intensität die Atmung der Fische erreichen und sogar übertreffen," sagt *Knauthe*[2, 3]) l. c. Außerdem sei in dieser Hinsicht verwiesen auf die Arbeiten von *Vernon*, *Zuntz*[4]) u. a. Bei kurz dauernden Versuchen und unter Benutzung reinen Wassers spielt dieser Faktor kaum eine Rolle. Man wird deshalb, wenn irgend möglich, diese Bedingungen immer suchen inne zu halten.

Um eine Vorstellung zu geben, wie stark und welcher Art die Änderungen im Gasgehalt von „reinem" Seewasser sind, seien zwei graphisch dargestellte Beispiele wiedergegeben, die einer Arbeit von *Fox* entnommen sind.

Wasser Nr. I (Fig. 308) wurde im Hochsommer aus dem Christiania Fjord geschöpft und in verschiedenen zugeschmolzenen sterilen Röhren verteilt, bei 25° aufgehoben und davon in verschiedenen Zeitintervallen Analysen gemacht.

Bedeutend stärkere Sauerstoffzehrung zeigt das Wasser Nr. II (Fig. 309), das der Bai von Christiania im Herbst entnommen und in derselben Weise wie Probe I aufbewahrt wurde. Es war "fairly clear only a little foetid".

Der Sauerstoff war bereits nach 32 Tagen völlig aufgezehrt.

Eine andere zahlenmäßige Angabe siehe bei *H. Winterstein.*[5])

---

[1]) *A. Pütter,* Studien zur vergleichenden Physiologie des Stoffwechsels. Abhandl der kgl. Ges. der Wissensch. zu Göttingen. Math.-phys. Kl. Neue Folge. VI. Nr. I (1908).

[2]) *K. Knauthe,* Untersuchungen über Verdauung und Stoffwechsel der Fische. Zeitschr. f. Fischerei. Jg. **6**. S. 139—184.

[3]) *K. Knauthe,* Zur Kenntnis des Stoffwechsels der Fische. *Pflügers* Arch. Bd. 73. S. 490 (1898/1899).

[4]) *N. Zuntz,* Ein Respirationsapparat für Wassertiere. Archiv für Physiol. 1901. (Verh. der Physiol. Ges. Berlin.) S. 543.

[5]) *H. Winterstein,* Bemerkungen über die in dunkel gehaltenem Seewasser auftretenden Änderungen des Sauerstoffgehaltes. Biochem. Zeitschr. Bd. **19**. pag. 425 (1904).

Eine Einschränkung einer eventuellen Fehlerquelle läßt sich stets erreichen, wenn man das zu verwendende Wasser filtriert und es so von Verunreinigungen und bis zu einem gewissen Grade von Mikroorganismen befreit. Jedenfalls wird dadurch den Bakterien ein weniger günstiger Boden geboten. Für die meisten Zwecke kommt man ohne Tonfilter (*Chamberland, Pullkal*) aus. Filtrierpapier, namentlich gehärtetes, leistet hinreichende Dienste.

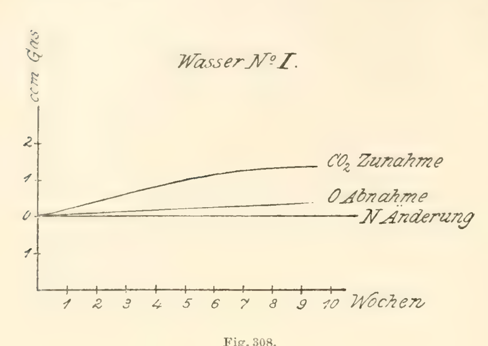



Fig. 308.

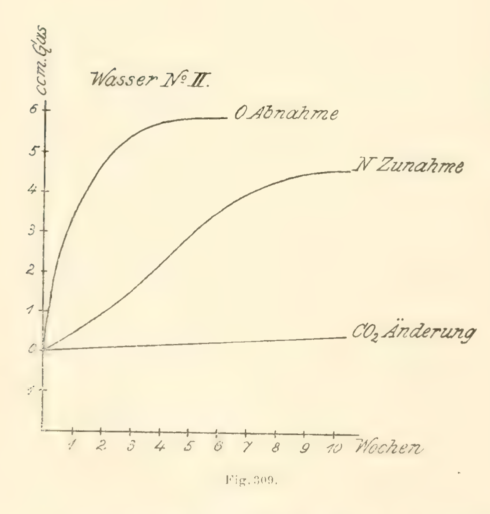



Fig. 309.

In bezug auf den Einfluß solcher Filtrationen und über die Veränderungen, die die Anwendung von Sandfiltern bedingen, sei auf die Studie von *Vernon* [1]) verwiesen. Nach *Vernon* wird das Wasser bei dieser Filtrationsweise fast allen Ammoniaks und des größten Teils des organischen Stickstoffs beraubt.

*Zuntz* [2]) arbeitete versuchsweise mit sterilem Wasser, doch brachte dies außer der großen Umständlichkeit noch andere Mißstände mit sich, so daß er wieder davon abkam.

Auch gutes Abwaschen der Tiere oder Organismen mit filtriertem oder sterilisiertem Wasser bietet einen nicht zu unterschätzenden Nutzen.

Die Beobachtung, ob bei länger dauernden Versuchen in gleichen Zeitintervallen der Respirationskoeffizient derselbe bleibt oder sich ändert.

[1]) *Vernon,* The relations between marine and vegetabile life. Mitteilung. aus der Zoolog. Stat. zu Neapel. Bd. **13**. S. 341—422 (1908).

[2]) *N. Zuntz,* Ein Respirationsapparat für Wassertiere. Archiv für Physiol. 1901. (Verh. der Physiol. Ges. Berlin.) S. 543.

dürfte in zweifelhaften Fällen einen Anhalt geben, ob Bakterienwirkung im Spiele ist.

*d)* Symbiose und Parasitismus:

Täuschungen hinsichtlich des wahren Respirationswechsels können bei gewissen Tieren dadurch entstehen, daß dieselben mit parasitären oder symbiotischen Organismen vergesellschaftet sind. So ist z. B. die oberste Schicht des Schwammes Suberites meist vollständig erfüllt mit kleinen Amphipoden (Atylus gibbosus) cf. *Pütter.*[1])

Als Beispiele für symbiotische Lebensweise sei an das Vorkommen von Zooxanthelen in Rhizopoden und Radiolaren aber auch in höheren Tieren, wie Aktinien, Korallen, Mollusken und Würmern hingewiesen. Vgl. die Untersuchung an Adamsia von *Trendelenburg.*[2])

Eine Zusammenstellung der Tiere, bei denen bisher Symbiose mit Zooxanthelen nachgewiesen wurde, siehe bei *Brandt.*[3])

II. TEIL.

## Allgemeine Erfahrungen über das Arbeiten mit Seetieren.

Die nachstehenden losen Notizen rein technischen Inhalts sind fast sämtlich im physiologischen Laboratorium der Neapeler Zoologischen Station gesammelt worden, wobei die Beschreibung nur solcher Methoden und Handgriffe aufgenommen wurde, die speziell für den Biochemiker in Frage kommen können.

An erster Stelle sei dabei auf zwei Abhandlungen hingewiesen, die wertvolle Notizen in bezug auf physiologische Untersuchungen an Meerestieren enthalten. Es sind dies:

1. *S. Lo Bianco,* Notizie biologiche riguardanti specialmente il periodo di maturità sessuale degli animali del golfo di Napoli. Mitt. der Zoolog. Stat. Neapel. Bd. 19. S. 513 bis 761 (1909).

2. *V. Bauer,* Einführung in die Physiologie der Cephalopoden. Ibid. Bd. 19. S. 145—268 (1909). Diese Arbeit bildet den ersten Teil einer Folge physiologischer Monographien.

### *a)* Fesselung der Tiere.

Cephalopoden. Eine Methode, die von *v. Uexküll* angegeben worden ist, besteht darin, daß man die Arme des Tieres in einen Sack steckt, der durch einen Zug hinter den Augen fest zugezogen und zur weiteren Sicherung mit Bindfaden umschnürt wird. Das so gefesselte Tier wird auf einem Halter (Fig. 310) mittelst übergreifender Metallbügel fixiert.

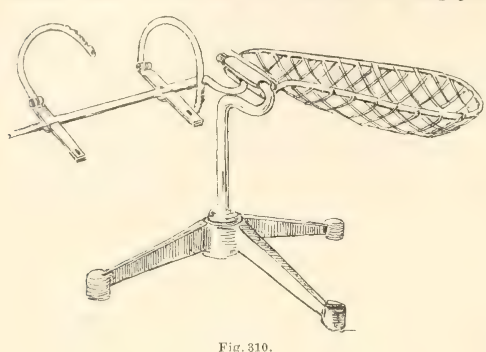
Für viele Zwecke (z. B. Blutentnahme) ist diese Art der Fixierung nicht vorteilhaft, da die Blutzirkulation zu stark gehemmt wird (vgl.

[1]) *A. Pütter,* Studien zur vergleichenden Physiologie des Stoffwechsels. Abhandl. der kgl. Ges. der Wissensch. zu Göttingen. Math.-Phys. Kl. Neue Folge. VI. Nr. I (1908).

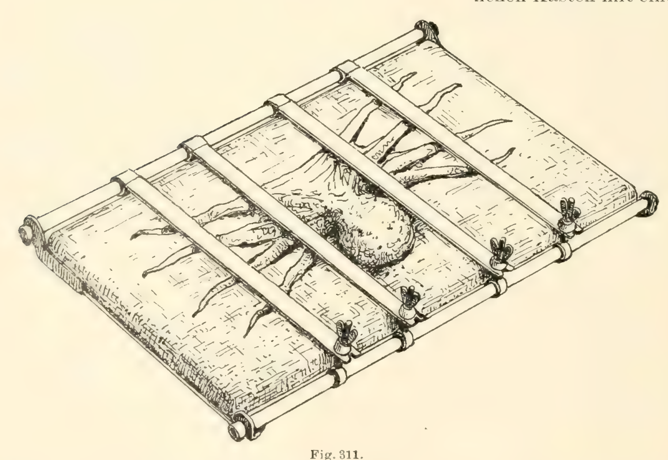
[2]) *Trendelenburg,* Versuche über den Gaswechsel bei Symbiose zwischen Alge und Tier. Arch. f. Anat. u. Physiol. Physiol. Abteilung. 1909. S. 42—70.

[3]) *K. Brandt,* Über Symbiose von Algen und Tieren. Arch. f. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abt.) 1883. S. 445.

z. B. auch *Fuchs*[1]). Verf. scheint in diesem Falle die folgende Methode zweckmäßiger (vgl. Fig. 311): Ein starkes Brett, mit grobem Drahtgitter überzogen, trägt an der oberen Seite verschiebbar angebrachte starke Eisenbügel, die gleichfalls mit Drahtgitter umkleidet sind. Die letzteren werden über die Arme des Tieres fest angepreßt und durch ebenfalls verschiebbare Schrauben festgelegt. Noch einfacher kann man verfahren, wenn man das Tier mit den Armen auf ein Brett festnagelt (*Fréderieq*[2]).


Fig. 310.

Ein anderes Verfahren, um Cephalopoden zu fesseln, stammt von *A. Mayer* und *F. Rathery*[3]). Verf. benutzen einen der Größe des Tieres angepaßten länglichen Kasten mit einem


Fig. 311.

Schiebedeckel. Eine der kurzen Seitenwände besteht aus zwei überein-

[1]) *S. Fuchs*, Beiträge zur Physiologie des Kreislaufes bei den Cephalopoden. *Pflügers* Arch. Bd. **60**. S. 173—204 (1895).

[2]) *L. Fréderieq*, Recherches sur la Physiologie du poulpe commun (Octopus vulgaris). Arch. de zool. expérim. T. **7**. p. 535 (1878).

[3]) *A. Mayer* et *F. Rathery*, Études sur le corps fungiforme du poulpe (Octopus vulgaris). Journ. Anatom. et Physiol. Paris. T. **43**. p. 25—47 (1907).

ander in ein und demselben Falz laufenden Brettern, die je einen guillotineförmigen Ausschnitt haben. Die Arme des Tieres werden in den Kasten gelegt, dieser schnell geschlossen und der sogenannte Hals des Tieres, der den Kopf von den Armen trennt, zwischen die Guillotine gepreßt. Das so immobilisierte Tier wird samt dem Kasten zur Erhaltung der Atmung in ein Bassin gelegt. Natürlich können zur künstlichen Atmung die Kiemen auch mit Wasser durch eine Kanüle (cf. unten) versorgt werden.

Fische. Ein Halter für operative Eingriffe an Fischen ist in Fig. 312 abgebildet. Er besteht aus einem der Größe des Tieres angepaßten Brett mit Ausschnitten, auf dem das Tier mittelst Bindfaden befestigt wird, während der Kopf noch besonders durch eine Art verschiebbaren Schuh fixiert wird. Die Ausschnitte des Brettes korrespondieren mit denjenigen an der Bauchseite des Tieres liegenden Stellen, wo sich die zu operierenden Organe

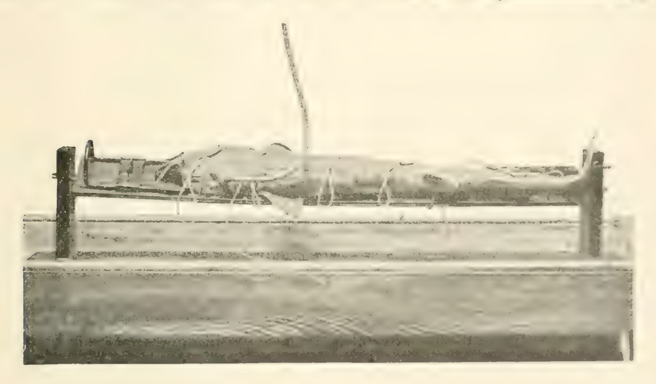


Fig. 312.

befinden. Auch ist das Brett um seine Längsachse drehbar, so daß die Bauchseite des Tieres leicht nach oben gebracht werden kann.

Die Atmung unterhält man bei den eben genannten Tieren mittelst einer in das Maul oder die Kiemenhöhle (Fische) resp. in den Mantel (Cephalopoden) eingeführten Kanüle, die ihrerseits mit der Seewasserleitung des Laboratoriums in Verbindung steht. Der Halter mit dem gefesselten Tier steht dabei auf einem mit Blei ausgeschlagenen Tisch, der einen Ablauf besitzt. Die bei Cephalopoden in den Mantel eingeführte Seewasserkanüle wird bei heftigen Kontraktionen des Mantels bisweilen herausgeschleudert. *Girod*[1]) half sich daher speziell bei Sepia auf folgende Weise. Er benutzte einen mit zwei Röhrenfortsätzen versehenen Gummiball, dessen Durchmesser größer war als der des Trichters des Tieres, und führte diesen von der

[1]) *P. Girod*, Recherches sur la poche du noir des céphalopodes des côtes de France. Arch. de Zoolog. Expérim. et Générale. T. **10**. p. 78 (1882).

Mantelöffnung aus (also von innen) in den Trichter ein. Der in die Kiemenhöhle ragende Kautschukfortsatz war außerdem durch ein angesetztes Glasrohr verlängert, das bis an das untere Ende der Kiemenhöhle reichte. Der andere Kautschukfortsatz ragte aus dem Trichter heraus und wurde mit einem Seewasser zuführenden Gummischlauch verbunden.

Crustaceen. Krebse lassen sich am einfachsten auf einem in einen Rahmen gespannten Drahtgitter durch Bindfaden fesseln.

*b)* **Blutentnahme.**

Cephalopoden: Das Blut dieser Tiere entnimmt man am einfachsten nach *Frédericq*[1]) der großen Kopfarterie, in die man eine Kanüle einbindet. Zu diesem Zwecke öffnet man den Mantel dorsal und präpariert die längs des Ösophagus verlaufende Arterie frei. Man unterbindet dieselbe peripher, spaltet nach Abklemmung den zentralen Teil und befestigt darin die Kanüle. Die Kanüle verbindet man mit einem dünnen Schlauch, aus dem das Blut in ein untergehaltenes Gefäß tropfen kann, und legt dann am besten das gefesselte Tier in ein größeres flaches Bassin, wo es ungehindert atmen kann. Nach meinen Erfahrungen ist letzteres besonders dann von Nutzen, wenn man möglichst viel Blut gewinnen will.

Auch die direkte Entnahme des Blutes aus den Gefäßen am lebenden Tier unter Luftabschluß zu Zwecken der Blutgasanalyse läßt sich bei Cephalopoden ausführen, wie *Winterstein*[2]) kürzlich gezeigt hat. — Zur Gewinnung des arteriellen Blutes benutzt man, wie soeben angeführt wurde, die große Dorsalarterie. In diese wird eine Kanüle eingebunden, die mit einem mit Quecksilber gefüllten Meßrohr in Verbindung steht, in welches man das Blut durch Senken eines mit dem Meßrohr kommunizierenden Quecksilbergefäßes einsaugt. Für die Entnahme des venösen Blutes sucht man die große Abdominalarterie auf. Man legt dieselbe durch einen Längsschnitt durch den Mantel frei, der von der den Mantel mit dem Atmungstrichter verbindenden Muskelbrücke nach der Mantelspitze zu verläuft. Die weitere Manipulation ist die gleiche wie oben.

Fische: Fischen, spez. Scyllium und Conger, entnimmt man das Blut in folgender Weise (vgl. z. B. *Nolf*[3]). Man trennt das Schwanzende mit einem scharfen Schnitt ab, indem das Tier vertikal mit dem Kopf nach unten gehalten wird. Hierauf wird eine lange Kanüle fest in die Schwanzarterie eingesteckt, die durch ihren seitlichen Druck gleichzeitig die darunter liegende Vene zupreßt. Nachdem das Tier wieder in horizontale Lage gebracht worden ist, wird unter Erhaltung künstlicher Atmung die Entblutung vorgenommen. Die Kanüle umgibt man am besten mit einem Wattebausch, um zu verhindern, daß eine Verunreinigung durch Geweb-

[1]) *L. Fréderica,* Recherches sur la Physiologie du poulpe commun (Octopus vulgaris). Arch. de zool. expérim. T. 7. p. 535 (1878).

[2]) *H. Winterstein,* Zur Kenntnis der Blutgase wirbelloser Seetiere. Biochem. Zeitschr. Bd. **19**. S. 384—424 (1909).

[3]) *P. Nolf,* La coagulation du sang des poissons. Arch. internat. de Physiolog. T. **4**. p. 216—259 (1906/07).

säfte eintritt. Soll nur eine Blutprobe entnommen werden, so kann man die Arterie sehr einfach schließen, indem man ein Holzpflöckchen in dieselbe einpreßt. Das Tier lebt ohne Störung weiter und ist jeden Moment zu neuer Blutentnahme fertig.

Crustaceen: Die einfachste Methode, um sich Blut von diesen Tieren zu beschaffen, besteht darin, daß man die Beine des Tieres zwischen zwei Gelenken mit einer Schere durchschneidet. Das Blut fließt so sauber aus. Bei Maja gewann *Winterstein* (cf. oben) das Blut auch direkt aus dem Perikardialsinus. Die Stelle, unter dem dieser liegt, ist auf dem Rückenpanzer durch eine seichte lyraförmige Furche gekennzeichnet. Innerhalb derselben bohrt man vorsichtig ein Loch, gerade so groß, um die Einführung einer Kanüle zu gestatten, durch die das Blut angesaugt werden kann. Die Öffnung läßt sich durch Wachs wieder verschließen, ohne daß eine Schädigung des Tieres nach dieser Manipulation zu befürchten wäre. Vgl. daselbst auch über die Gewinnung des Blutes einiger anderer Seetiere.

### *c)* Aufsammlung von Exkreten und Sekreten.

Cephalopoden. Den Harn von Oktopoden gewann *v. Fürth*[1]) durch Katheterisieren von Tieren, denen zuvor die Ureter einige Zeit unterbunden worden waren. Die Tiere wurden auf dem *Uexküll*schen Halter gefesselt und der Mantel an der Bauchseite geöffnet, und zwar durch einen 2—3 *cm* langen Einschnitt, der etwa 2 *cm* von der Mittellinie und 3 *cm* von dem oberen Mantelrande beginnend in der Richtung von innen nach hinten außen verläuft. Dadurch legt man die Ureterpapille frei, unterbindet sie und schließt die Wunde wieder durch passende Nähte. Dasselbe wiederholt man auf der anderen Seite.

*Mayer* und *Rathery*[2]) haben ein besseres Verfahren angegeben. — Man kann einen Octopus, wie man sich im Neapeler Laboratorium ausdrückt, leicht „umkrempeln". Während das Tier mit einem um die Arme gewundenen Tuch von einem Gehilfen gehalten wird, zieht man mit zwei in den Mantel eingeführten Fingern dessen Rand vom Rumpfe ab und durchtrennt mit einem Scherenschnitte die kleine Muskelbrücke zwischen Rumpf und Mantel. Jetzt läßt sich der Mantel leicht wie ein Handschuh umkrempeln, so daß der ganze Eingeweidesack mit allen Organen freigelegt wird. Der Mantel kann in umgekehrtem Sinne wieder umgeschlagen werden. Das Tier erträgt die Operation ohne Schädigung. Obengenannte Autoren benutzten dieses Verfahren und banden dem umgekrempelten Tiere Kanülen, die mit feinen Kautschukballons (Kondom) verschlossen waren, in die Ureter ein, in denen sich dann der Harn ansammelte.

---

[1]) *O. v. Fürth,* Über den Stoffwechsel der Cephalopoden. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **31**. S. 353—380 (1900).

[2]) *A. Mayer* et *F. Rathery,* Études sur le corps fungiforme du poulpe. (Octopus vulgaris.) Journ. Anatom. et Physiol. Paris. T. **43**. p. 25—47 (1907).

Das Sekret der großen hinteren Speicheldrüsen läßt sich bei Octopoden, besonders geeignet ist Octopus macropus, aus der Drüse in situ gewinnen (*Krause*[1]), *Hyde*[2]), *Henze*.[3]) Man bindet eine Kanüle in den gemeinsamen Ausführungsgang der beiden Drüsen ein und reizt denselben durch Induktionsschläge. Vgl. die Abbildungen bei *Hyde*.

*Falloise*[4]) ist es gelungen, eine Kanüle in die Ausführungsgänge des Hepatopankreas der Cephalopoden einzubinden und auf diese Weise reinen Pankreassaft zu gewinnen. Die Tiere werden von der Dorsalseite aus geöffnet, der eine der Ausführungsgänge unterbunden und in den anderen eine kurze Kanüle befestigt, die einen kleinen Kautschukballon trägt, in welchem sich das Sekret ansammelt. Die Wunde wird gut vernäht. Octopus vulgaris ertrug die Operation nur 12—24 Stunden. Eledone moschata lebte bis zu 5 Tagen.

Fische. Den Harn von Scyllium kann man mittelst eines zuerst von *Herter*[5]) angegebenen Apparates auffangen. Fig. 313 zeigt das Tier mit dem

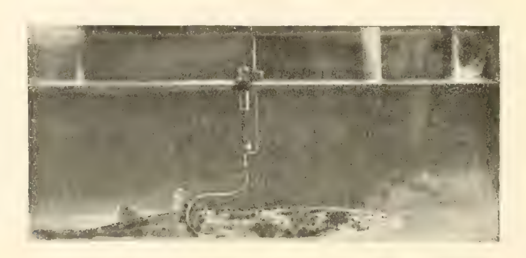


Fig. 313.

applizierten Apparat. Dem Tiere wird eine Kanüle in den Sinus urogenitalis eingebunden, die durch einen nicht zu kurzen Gummischlauch mit einem durch einen Kork auf dem Wasser flottierend erhaltenen Reagenzrohr in Verbindung steht. In dem Maße, als sich letzteres mit Harn füllt, entweicht die verdrängte Luft durch ein *Bunsen*sches Ventil. Der Apparat wird durch einen Stich an die Rückenflosse des Tieres angeheftet und stört die freien Bewegungen desselben durchaus nicht.

[1]) *R. Krause*, Bau und Funktion der hinteren Speicheldrüsen der Octopoden. Sitzungsber. Akad. Berlin 1897. S. 1085.

[2]) *J. H. Hyde*, Beobachtungen über die Sekretion der sogenannten Speicheldrüsen von Octopus macropus. Zeitschr. f. Biol. Bd. 35. N. F. S. 459—477 (1897).

[3]) *M. Henze*, Chemisch-physiologische Studien an den Speicheldrüsen der Cephalopoden. Zentralbl. f. Physiol. Bd. **19**. Nr. 26 (1905).

[4]) *A. Falloise*, Contribution à la Physiologie comparée de la digestion. La digestion chez les Cephalopodes. Arch. intern. de Physiol. T. **3**. p. 282—305 (1905/06).

[5]) *E. Herter*, Zur Kenntnis des Stoffwechsels der Fische, speziell der Selachier. Mitt. aus der Zool. Stat. zu Neapel. Bd. **10**. S. 342—354 (1891/93).

*Burian*[1]) hat dieses Prinzip der Harnaufsammlung neuerdings auch bei den verschiedensten Knochenfischen angewandt und je nach den anatomischen Verhältnissen speziell geeignete Kanülen und Befestigungsweisen erfunden. Eine ausführliche Publikation mit anatomischen Abbildungen ist während der Drucklegung erschienen, so daß auf diese verwiesen werden muß. Auch sind daselbst Verbesserungen über die Harngewinnung bei Scyllium angegeben.

Reinen Magensaft von Scyllium hat *Weinland*[2]) erhalten. Er führte eine Kanüle in den Magen ein, die infolge des anatomischen Baues des Magens nicht über denselben hinaus in den Darm gelangen kann und heberte den Magen aus. Diese Methode ist weit bequemer als die Anlegung einer Fistel. Eine Magenfistel läßt sich nach *Weinland* gleichfalls anlegen.

### *d)* Exstirpationen.

Cephalopoden: An Eledone gelang es das gesamte Hepatopankreas zu exstirpieren und die Tiere am Leben zu erhalten. (Nicht publiziert.)

Fische: An dem so resistenten Scyllium hat zuerst *v. Schröder*[3]) Leberexstirpationen vorgenommen, die keinerlei Schwierigkeiten bieten und die die Tiere bis zu 3 Tagen ertragen. Vgl. auch *Nolf*.

Ebenfalls an Scyllium hat *Diamare* Pankreasabtragungen und vollständige Exstirpationen gemacht.[4])

### *e)* Physiologische Lösungen.

Nach den Untersuchungen von *Frédericq*, *Bottazzi* etc. sind die Körperflüssigkeiten (Blut, Hämolymphe) der niederen Meerestiere isotonisch mit dem Seewasser, und zwar infolge des anorganischen quantitativ gleichen Salzgehalts. Als sogenannte physiologische Kochsalzlösung wendet man daher für sie einfach Seewasser an. Bei Selachiern herrscht zwar Isotonie zwischen Blut und Seewasser, doch ist der Betrag der anorganischen Salze des Blutes geringer als im Seewasser. Das Blut erlangt den erforderlichen osmotischen Druck durch die gleichzeitige Anwesenheit von Harnstoff. *Baglioni*[5]) hat in Anbetracht dieser Erfahrung daher zuerst darauf hingewiesen, daß für Selachier als physiologische Kochsalzlösung eine Lösung zu benutzen sei, die sich zusammensetzt aus 100 $cm^3$ Leitungswasser (Calciumsalze), 2 *g* NaCl und 2 *g* Harnstoff. Als beste Ersatzflüssigkeit für Selachierblut empfiehlt *Fühner*[6]):

---

[1]) *R. Burian*, Methoden zum Auffangen von Fischharn. Zeitschr. f. biol. Technik und Method. Bd. **1**. S. 383 (1909).

[2]) *E. Weinland*, Zur Magenverdauung der Haifische. Zeitschr. f. Biolog. Bd. **41** (1901). N. F. S. 35 und 275.

[3]) *W. v. Schroeder*, Über die Harnstoffbildung der Haifische. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **14**. S. 576 (1890).

[4]) Genaue Beschreibungen und Abbildungen sollen demnächst in den Mitteilungen der Zoologischen Station publiziert werden.

[5]) *S. Baglioni*, Die Bedeutung des Harnstoffs bei den Selachiern. Zentralbl. f. Physiol. Bd. **19**. S. 385 (1905).

[6]) *H. Fühner*, Über eine Speisungsflüssigkeit für Selachierherzen. Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. **8**. S. 485 (1908).

| | | |
|---|---|---|
| Natriumbikarbonat . | 0·2 *g* | pro 1000 dest. Wasser. |
| Calciumchlorid sicc. . | 0·2 „ | |
| Kaliumchlorid . . . | 0·1 „ | |
| Natriumchlorid . . . | 20·0 „ | |
| Harnstoff . . . . | 25·0 „ | |

Das Blut der Knochenfische wird durch die bekannte Ringerlösung ersetzt.

## ANHANG.

### Chemische und physikalische Notizen über Seewasser.

Die folgenden auf das Seewasser sich beziehenden Angaben und Literaturnachweise dürften beim Arbeiten mit Seetieren des öfteren von Nutzen sein. Alle Details sind weggelassen, da diese dem Gebiet der Hydrographie angehören.[1]) Die Angaben beziehen sich fast ausschließlich auf den Golf von Neapel resp. auf die Aquarien der dortigen Zoologischen Station.

*a)* Zusammensetzung des Seewassers:

Nach *Forchhammer* (cf. *Roth*[2]), dem wir die meisten Untersuchungen über die Zusammensetzung der Meerwässer verdanken, hat das Oberflächenwasser der Ozeane (ausgenommen sind die Meere, welche den Charakter von Baien des Weltmeeres haben) im Durchschnitt die folgende Zusammensetzung:

In 1000 Teilen Wasser sind enthalten in Grammen:

| | | |
|---|---|---|
| $NaCl$ | 26·862 | |
| $KCl$ | 0·582 | |
| $MgCl_2$ | 3·239 | |
| $MgSO_4$ | 2·196 | Chlorgehalt 18·999. |
| $CaSO_4$ | 1·350 | |
| Rest | 0·070 | |
| | 34·299 | |

Das Wasser des Mittelmeeres hat bekanntlich eine höhere Konzentration. Die Analyse einer Wasserprobe, die zwischen Sardinien und Neapel geschöpft wurde, ergab *(Forchhammer)*:

| | | |
|---|---|---|
| $NaCl$ | 30·292 | |
| $KCl$ | 0·779 | |
| $MgCl_2$ | 3·240 | |
| $MgSO_4$ | 2·638 | Chlorgehalt 19·999. |
| $CaSO_4$ | 1·605 | |
| Rest | 0·080 | |
| | 38·634 | |

[1]) Die beste Übersicht auf diesem Gebiet gibt: Handbuch der Ozeanographie von *O. Krümmel.* (Bibliothek geographischer Handbücher.) I. Teil. 1907.

[2]) *J. Roth,* Allgemeine und chemische Geologie. Bd. 1.

Der Salzgehalt der Aquarien der Zoologischen Station ist meist noch höher, und zwar infolge der fortwährenden Verdunstung, der das zirkulierende Wasser ausgesetzt ist. Vgl. auch den Abschnitt: „Spezifisches Gewicht". Nach *Vernon*[1]) schwankte der Salzgehalt des Wassers der Aquariumbassins zwischen 42·986 *g* und 43·939 *g* pro 1000 *cm*³.[2])

In der Hydrographie pflegt man den Salzgehalt einfach durch den Chlorgehalt (Cl ‰) anzugeben, indem man die Spur Brom, die sich immer im Seewasser findet, als Chlor rechnet. Die Chlorbestimmung läßt sich schnell durch Titration mit Silbernitrat ausführen. Mit Hilfe der von *Knudsen*[3]) abgeleiteten Interpolationsformel berechnet sich aus dem Chlorgehalt der Salzgehalt (S) zu

$$S = 0{\cdot}030 + 1{\cdot}8050 \,.\, Cl.$$

*b)* Gasgehalt und Absorptionskoeffizienten des Seewassers für die atmosphärischen Gase:

Einige Beispiele für den mittleren Gasgehalt des Seewassers finden sich in Kapitel I unter „Respiratorischer Gaswechsel".

Handelt es sich darum, die theoretisch möglichen Mengen der atmosphärischen Gase zu berechnen, mit denen sich Seewasser unter verschiedenen Bedingungen zu sättigen vermag, so liefern hierzu das vollständigste Material die neuesten Arbeiten von *Fox*.[4]) Die auf Grund sehr sorgfältiger experimenteller Untersuchungen zusammengestellten Tabellen enthalten die Werte der Absorptionskoeffizienten für Sauerstoff und Stickstoff für verschiedene Temperaturen und verschiedenen Salzgehalt unter 760 *mm* Druck. In dem zweiten Teil der Arbeit finden sich Tabellen und Formeln zur Berechnung des Absorptionskoeffizienten der Kohlensäure, der bekanntlich außer von Druck, Temperatur und Salzgehalt auch noch abhängig ist von der Alkalinität des Wassers.

Hat man z. B. in einer Seewasserprobe experimentell bestimmt, wie groß ihr Gehalt an O, N und $CO_2$ ist, so läßt sich mit Hilfe der *Fox*schen Tabellen ohne weiteres feststellen, ob die betreffende Probe in bezug auf die drei Gase gesättigt ist.

*c)* Die sogenannte „Alkalinität" des Seewassers:

*Tornoë*[5]) wies zuerst darauf hin, daß Seewasser auf Indikatoren wie Rosolsäure oder Lackmus alkalisch reagiere. Diese Beobachtung stand im Einklang

---

[1]) *Vernon*, The respiratory exchange of lower marine invertebrates. Journ. of Physiol. Vol. **19**. p. 18—70 (1896).

[2]) Diese Zahlen dürften jedoch nicht ganz richtig sein, da sie nicht nach einer einwandsfreien Methode bestimmt wurden.

[3]) Eine tabellarische Zusammenstellung der Beziehungen zwischen Konzentration, Chlorgehalt etc. findet man in *M. Knudsen*, Hydrographische Tabellen (Kopenhagen und Hamburg 1901).

[4]) *Chas. J. J. Fox*, On the coefficients of absorption of the atmospheric gases in distilled water and sea water. Part I: Nitrogen and oxygen. Public. de circonstance. Nr. 41 (1907). Part II: Carbonic acid. Ibid. Nr. 44 (1909).

[5]) *H. Tornoë*, On the carbonic acid in the sea water. The Norwegian North-Atlantic Expedition 1876—78. Chemistry. Vol. 2.

mit der folgenden Tatsache: Bei der exakten Analyse der Mineralbestandteile des Seewassers zeigt sich, daß die Basen (Na, K, Ca, Mg) gegenüber den Mineralsäuren (HCl, $H_2SO_4$) im Überschuß auftreten. Dieses Plus an Basen ist an Kohlensäure gebunden. Nun reicht die gesamte im Seewasser vorhandene Kohlensäure nicht aus, um diesen Basenüberschuß völlig in Bikarbonat zu verwandeln, während andrerseits der Betrag der Kohlensäure größer ist, um alles Alkali als neutrales Karbonat abzusättigen.[1]) Wahrscheinlich ist die Kohlensäure an Calcium und zum geringeren Teil an Magnesium gebunden, mit denen sie wechselnde Mengen von neutralen und sauren Karbonaten bildet.[2])

Unter „Alkalinität" des Seewassers versteht man nun nach Übereinkunft das obengenannte Alkaliplus, ausgedrückt in Gramm oder Kubikzentimeter $CO_2$ pro Liter.[3])

Bestimmung der „Alkalinität" des Seewassers: *Tornoë*[4]) kocht ein bestimmtes Quantum Seewasser unter Ansäuerung mit einer gemessenen, überschüssigen Menge titrierter Schwefelsäure aus, und zwar unter Durchleitung eines kohlensäurefreien Luftstromes, wobei die Gesamtkohlensäure bestimmt wird. (Vgl. Bestimmung der Gesamtkohlensäure, S. 1074.) In der ausgekochten Wasserprobe wird der Überschuß der Schwefelsäure zurücktitriert. Die tatsächlich verbrauchte Menge Schwefelsäure, umgerechnet auf Kubikzentimeter oder Milligramm Kohlensäure, gibt die Alkalinität.

Die durch Titration in der ausgekochten Wasserprobe bestimmte Kohlensäure stellt diejenige Menge dar, die sich mit dem vorhandenen Alkaliplus zu neutralen Karbonaten verbinden würde. Subtrahiert man diese Menge von der Gesamtkohlensäure, so erhält man als Differenz diejenige Kohlensäuremenge, welche zur Bildung von saurem Karbonat beansprucht wird.

*d)* Die Reaktion des Seewassers:

Die Reaktion des Seewassers wurde, wie im vorhergehenden Abschnitt erwähnt wurde, bis vor kurzem allgemein für alkalisch erklärt, indem man sich auf die Prüfung mit gewissen Indikatoren berief. Neue Erfahrungen haben jedoch gelehrt, daß die Reaktion einer Flüssigkeit, deren Reaktion nahe am Neutralitätspunkte gelegen ist, sich nicht ohne weiteres

---

[1]) An gewissen lokalen Punkten des Ozeans können unter Umständen Ausnahmen von dieser Regel beobachtet werden.

[2]) Diese ältere Anschauung über die Bindungsweise der Kohlensäuren entspricht nicht mehr den heutigen Tatsachen der physikalischen Chemie. Eine ausführliche Darlegung der Verhältnisse, die hier zu weit führen würde, findet sich in der Arbeit von *Fox* [*Chas. J. J. Fox*, On the coefficients of absorption of the atmospheric gases in distilled water and sea water. Part II. Carbonic acid. Public. de circonstance. Nr. 44 (1909)].

[3]) Nebenbei erwähnt wäre es nach *Fox* richtiger, die Alkalinität nicht in Kubikzentimeter oder Gramm Kohlensäure anzugeben, sondern in Gramm OH $^0/_{00}$ entsprechend dem Brauch der Hydrographen, den Salzgehalt in Gramm Cl $^0/_{00}$ auszudrücken.

[4]) *H. Tornoë,* On the carbonic acid in the sea water. The Nowegian North-Atlantic Expedition 1876—78. Chemistry. Vol. 2.

mit Hilfe eines Indikators feststellen läßt. Bestimmt wird die Reaktion allein durch die Größe des H- oder OH-Ionengehaltes. Untersuchungen des Seewassers mittelst der Gaskette haben nun, und darauf hat *Loeb*[1]) zuerst hingewiesen, gezeigt, daß demselben eine nahezu neutrale Reaktion zukommt.

Zu dem gleichen Resultat kamen *Friedenthal*[2]) und *Fox*.[3]) Die Konzentration der OH-Ionen liegt nach *Fox* (Messung mit der Gaskette) zwischen $1 \times 10^{-7}$ bis $1 \times 10^{-9}$.

Das Seewasser verhält sich demnach in bezug auf seine Reaktion wie das Blutserum der Wirbeltiere, mit dem es andererseits auch die große Unempfindlichkeit gegen kleinere Reaktionsverschiebungen gemeinsam hat.

Mit recht großer Genauigkeit läßt sich in kurzer Zeit die Ionenkonzentration des Seewassers mit Hilfe der von *Friedenthal* und *Salm* aufgestellten Indikatorenreihe ermitteln. Einige Angaben vgl. bei *Bethe*.[4])

*e)* Spezifisches Gewicht:

Über das spezifische Gewicht des Wassers aus dem Golf von Neapel geben eine Reihe von Beobachtungen von *Vernon*[5]) Aufschluß. Die Dichte bewegt sich in den Grenzen von

1·02795 bis 1·02890 (korrig. auf 15·56 nach *Dittmar*).

Die im Aquarium vorgenommenen Bestimmungen dagegen schwankten zwischen 1·02859 und 1·02964.

Es entspricht dieser Unterschied zwischen Golf und Aquarium nach *Vernon* einem osmotischen Druck von 180 *mm* Hg. Besonders anschaulich kommt diese Differenz bei folgender Umrechnung zum Ausdruck. Es müßten nämlich nicht weniger als 10 Liter destilliertes Wasser zu 1 $m^3$ Aquariumseewasser gegeben werden, um dieses auf das spezifische Gewicht des normalen Seewassers zu bringen.

Weitere Angaben cf. auch bei *Bethe*.[6])

*f)* Gefrierpunkt des Seewassers:

Gefrierpunktsbestimmungen des Mittelmeerwassers aus dem offenen Meere sind nicht bekannt.

Für das Wasser der Aquarien der Zoologischen Station (Neapel) sind viele Bestimmungen infolge der Arbeiten von *Frédericq* und von *Bottazzi*

---

[1]) *J. Loeb*, Über die Reaktion des Seewassers und die Rolle der Hydroxylionen bei der Befruchtung der Seeigeleier. *Pflügers* Arch. Bd. **99**. S. 637.

[2]) *H. Friedenthal*, Über die Reaktion des Blutserums der Wirbeltiere und die Reaktion der lebendigen Substanz im allgemeinen. Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. 4 S. 44 (1904).

[3]) *Chas. J. J. Fox*, On the coefficients of absorption of the atmospheric gases in distilled water and sea water. Part I: Nitrogen and oxygen. Public. de circonstance. Nr. 41 (1907). Part II: Carbonic acid. ibid. Nr. 44 (1909).

[4]) *A. Bethe*, Die Bedeutung der Elektrolyten für die rhythmischen Bewegungen der Medusen. II. Teil. *Pflügers* Arch. Bd. **127**. S. 219—274 (1909).

[5]) *Vernon*, The respiratory exchange of lower marine invertebrates. Journ. of Physiol. Vol. **19**. p. 18—70 (1908).

[6]) *A. Bethe*, Die Bedeutung der Elektrolyten für die rhythmischen Bewegungen der Medusen. I. Teil. *Pflügers* Arch. Bd. **124**. S. 541—577 (1908).

über die Beziehungen zwischen dem osmotischen Druck der Körperflüssigkeiten der marinen Tiere und dem umgebenden Seewasser ausgeführt worden.

Nach *Bottazzi*[1]) beträgt für das Wasser der Aquarien

$$\triangle = 2{\cdot}269^0 \text{ und } 2{\cdot}279^0 \text{ (2. Juni 1905).}$$

Kleine Variationen sind natürlich vorhanden, genau so wie sie im Salzgehalt und dem spezifischen Gewicht zum Ausdruck kommen.

*g)* Elektrische Leitfähigkeit:

Über die Beziehungen zwischen elektrischer Leitfähigkeit und Salzkonzentration des Seewassers existiert eine Publikation von *E. Ruppin.*[2])

*Bottazzi*[1]) bestimmte die Leitfähigkeit des Wassers der Aquarien (Zoologische Station) schwankend je nach der Jahreszeit zu

$$k = 544 \times 10^{-4} \text{ bis } 550 \times 10^{-4} \text{ bei } 21{\cdot}5^0.$$

*h)* Temperatur des Seewassers:

Es soll hier lediglich eine Notiz über die in Neapel beobachteten Temperaturen Platz finden. Das Wasser unmittelbar an der Oberfläche des Golfes zeigt eine ungefähre Jahresschwankung zwischen 13⁰ im Januar und 26⁰ im August, Beobachtungen von *Lo Bianco.*

Im Aquarium liegt das Temperaturminimum und -Maximum dagegen zwischen 9⁰ im Januar und 23·4⁰ im August (cf. auch *Vernon*[3]).

*i)* Künstliches Seewasser:

Kommt man in die Lage, künstliches Seewasser anwenden zu müssen, so sind zufolge der Literatur bisher nachstehende Vorschriften gegeben worden:

*Herbst*[4]) verwendet, speziell für entwicklungsmechanische Fragen in letzter Zeit, ein nach folgenden Verhältnissen zusammengesetztes Wasser. In 100 *cm*³ destilliertem Wasser werden gelöst:

| | |
|---|---|
| $NaCl$ | 3 *g* |
| $KCl$ | 0·08 *g* |
| $MgSO_4$ | 0·66 *g* |
| $CaCl_2$ | 0·13 *g* |

Dieser Lösung wird 1 *cm*³ einer 4·948⁰/₀igen $NaHCO_3$-Lösung zugesetzt.

Nach *Forchhammers* und den neuen Arbeiten *van't Hoffs* ist das gegenseitige Verhältnis der im Seewasser gelösten Salze für alle Meere ein konstantes: nur die Calciumsalze nehmen eine Ausnahmestellung ein. Fußend

[1]) *F. Bottazzi,* Sulla regolazione della pressione osmotica negli organismi animali. Arch. di Fisiol. Bd. **3**. S. 422 (1905).

[2]) *E. Ruppin,* Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit des Meerwassers etc. Wissensch. Meeresunters. Abtlg. Kiel. Bd. **9**. Neue Folge. S. 177 (1909).

[3]) *Vernon,* The respiratory exchange of lower marine intervertebrates. Journ. of Physiol. Bd. **19**. S. 18—70 (1896).

[4]) *C. Herbst,* Über die zur Entwicklung der Seeigellarven notwendigen anorganischen Stoffe, ihre Rolle und ihre Vertretbarkeit. Arch. für Entw.-Mechan. Bd. **17**. S. 306 (1903/04).

auf dieser Tatsache benutzt *Loeb*[1]) die Salze in der folgenden Molekularkonzentration:

100 $NaCl$, 2·2 $KCl$, 7·8 $MgCl_2$, 3·8 $MgSO_4$.

Hierzu fügt *Loeb* 1—2 Mol. $CaCl_2$. Die Lösung wird soweit verdünnt, bis ihr spezifisches Gewicht mit dem des Seewassers korrespondiert, aus dem die Tiere stammen. Außerdem fügt er bei Entwicklungs- oder Regenerationsversuchen pro 100 *cm*³ der Lösung ca. 1 *cm*³ einer $\frac{3}{8}$ m $NaHCO_3$-Lösung zu.[2])

Letzthin hat sich *Bethe*[3]) mit der Herstellung eines dem natürlichen Seewasser physiologisch gleichwertigen künstlichen Seewassers beschäftigt. Nach Ansicht *Bethes* soll die Hauptbedingung für ein solches künstliches Wasser die sein, daß dasselbe annähernd mit Calciumkarbonat gesättigt ist. Andere Calciumsalze, z. B. $CaSO_4$ oder $CaCl_2$, sollen angeblich das Karbonat nicht ersetzen können.

Am besten bereitet man sich von jedem einzelnen Salz eine Lösung von 1 Gramm-Mol. im Liter (Normallösung) und mischt diese im Verhältnis der nebenstehenden Tabelle, indem man die Chloride titriert, die Sulfate eventuell durch eine Schwefelsäurebestimmung kontrolliert.

| Salz | *a* | *b* | *c* | *d* |
|---|---|---|---|---|
| $NaCl$ . . . . . . . | 30·292 | 58·5 | 51·8 | 100·0 |
| $KCl$ . . . . . . . . | 0·779 | 74·5 | 1·0 | 2·0 |
| $MgCl_2$ . . . . . . . | 3·240 | 95·3 | 3·4 | 6·6 |
| $MgSO_4$ . . . . . . . | 2·638 | 120·4 | 2·2 | 4·2 |
| $CaSO_4$ . . . . . . | 1·605 | 136·2 | 1·2 | 2·3 |

In dieser Tabelle bedeuten:

*a)* Verhältnis der Salze nach *Forchhammer* in Gramm pro Liter (Mittelmeer).

*b)* Molekulargewichte derselben.

*c)* Anzahl der Kubikzentimeter Normallösung, welche zusammengemischt und dann mit destilliertem Wasser auf 100 *cm*³ verdünnt werden müssen, um 100 *cm*³ künstliches Seewasser von der unter *a)* gegebenen Zusammensetzung zu erhalten.

*d)* Alle Verhältnisse auf $NaCl = 100$ bezogen.

NB. Da von $CaSO_4$ sich keine Normallösung darstellen läßt, setzt man dieses abgewogen in Substanz zu. Einfacher benutzt man $CaCl_2$ an Stelle von $CaSO_4$, wobei die Anzahl der Kubikzentimeter dieselbe wie die für $CaSO_4$ unter *a)* und *d)* angegebene bleibt.

[1]) *J. Loeb,* On the relative toxicity of distilled water, sugar solutions and solutions of the various constituents of the sea water for marine animals. University of California Publ. (Physiolog.) Vol. 1. p. 55.

[2]) Vgl. auch Abschnitt XIV der Deutschen Ausgabe seines Buches: *J. Loeb,* Untersuchungen über künstliche Parthenogenese. Leipzig, Ambrosius Barth (1906).

[3]) *A. Bethe,* Die Bedeutung der Elektrolyten für die rhythmischen Bewegungen der Medusen. I. Teil. *Pflügers* Archiv. Bd. 124. S. 541—577 (1908).

# B. Methodik des Energiestoffwechsels.

Von **J. E. Johansson,** Stockholm.

## I. Stoff- und Energieumsatz.

Man scheidet zwischen dem allgemeinen und dem intermediären Stoffwechsel. Zum letzteren rechnet man die chemischen Vorgänge in den verschiedenen Organen, die einzelnen Stufen der Umsetzungen im Körper. Der allgemeine Stoffwechsel bezieht sich auf den Körper als ein Ganzes und stellt also die Summe der intermediären Stoffwechselprozesse dar. Im folgenden werden wir hauptsächlich die Untersuchungsmethoden des allgemeinen Stoffwechsels berücksichtigen.

Diese Untersuchungen zielen zunächst darauf ab, teils die Größe des Stoff- und Energieumsatzes pro Tag, Stunde oder Minute zu bestimmen, teils die Zu- oder Abnahme der verschiedenen Vorräte im Körper zu ermitteln. (Bilanzversuche.)

### 1. Die Komponenten des Stoffwechsels.

Die Körperbestandteile, welche bei dem allgemeinen Stoffwechsel in Betracht kommen, gehören der Gruppe der Eiweißkörper, der Fette, der Kohlehydrate und der mineralischen Bestandteile (Asche) an. Die Nahrungsstoffe lassen sich im großen und ganzen auf dieselben Gruppen verteilen. Es handelt sich also bei den Bilanzversuchen darum, den Gewinn oder den Verlust des Körpers in bezug auf jene Gruppen von Stoffen zu ermitteln, d. h. die positiven oder negativen Eiweiß-, Fett-, Kohlehydrat- und Aschenbilanzen abzuleiten.

Der Stoffverbrauch und der entsprechende Energieumsatz wird gewöhnlich auf die drei Komponenten Eiweiß-, Fett- und Kohlehydratumsatz verteilt. Diese Verteilung ist, wie die eben erwähnte Bilanzberechnung, als ein Annäherungsverfahren zu betrachten, welches man zur Vereinfachung der Berechnung einführt. Die einzelnen Umsetzungen im Körper sind größtenteils unbekannt. Nur die Endprodukte sind der Beobachtung zugänglich. Aus diesen Endprodukten kann man ein aus Eiweiß, Fett und Kohlehydrate zusammengesetztes Material rechnerisch

rekonstruieren, welches der umgesetzten Nahrung oder dem umgesetzten Körpermaterial entspricht.

Zu diesem Zwecke muß man eine gewisse durchschnittliche Zusammensetzung der betreffenden Substanzen annehmen. Für das Körpereiweiß nimmt man gewöhnlich entfettetes Rindfleisch als Repräsentant an, welches außer Eiweiß auch Extraktivstoffe enthält. Für die Fette wird die mittlere Zusammensetzung des tierischen oder des menschlichen Fettes angenommen und für die Kohlehydrate diejenige der Stärke oder des Glykogens. Wir führen hier diejenigen Zahlen an, welche von verschiedenen Forschern bei den Berechnungen des Stoffwechsels benutzt werden. Die Zahlen beziehen sich auf aschefreie Substanz. Zugleich ist die entsprechende Verbrennungswärme ebenfalls pro Gramm aschefreie Substanz nebst dem Aschengehalt der Trockensubstanz angegeben.

| | C | H | N | O | S | Kal. | Asche | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rindfleisch (entfett.) | 53·40 | 8·04 | 16·30 | 22·19 | | 5·656 | 5·5 | *Rubner*[1]) |
| „ . . . . . . | 52·02 | 7·30 | 16·36 | 24·32 | | 5·641 | 5·32 | *Stohmann*[1]) |
| „ . . . . . . | 52·33 | 7·30 | 16·15 | 24·22 | | — | 5·2 | *Argutinski*[1]) |
| „ . . . . . . | 52·54 | 7·14 | 16·67 | 23·12 | 0·52 | 5·678 | 5·38 | *Köhler*[1]) |
| „ . . . . . . | 52·26 | 7·37 | 17·12 | 23·25 | | 5·575 | 4·9 | *Frenzel*[2]) |
| Muskeleiweiß (extr.-frei) | 54·7 | 6·7 | 16·6 | 22·0 | | 5·778 | 0·42 | *Rubner*[3]) |
| Körpereiweiß . . . . . | 52·80 | 7·00 | 16·67 | 22·00 | 1·53 | 5·65 | — | *Benedict*[4]) |
| Nahrungseiweiß . . . . | 53 | 7 | 16 | 23 | 1 | 5·65 | — | *Atwater*[5]) |
| Fett (tier.) . . . . . . | 76·54 | 12·01 | — | 11·45 | — | 9·46 | — | *Zuntz*[6]) |
| „ (menschl.) . . . . | 76·08 | 11·80 | — | 12·12 | — | 9·54 | — | *Benedict*[4]) |
| Glykogen, Stärke . . . | 44·44 | 6·17 | — | 49·38 | — | 4·18 | | *Zuntz*[6]) |

## 2. Physiologische Verbrennungswerte.

Der Zusammenhang zwischen Stoff- und Energieumsatz wird durch die physiologischen Verbrennungswerte angegeben. Jedem Umsatze entspricht eine gewisse Wärmeentwicklung, welche nach dem Gesetze von *Heß* nur von dem Anfangs- und dem Endstadium abhängt. Für Fette und Kohlehydrate kann man eine vollständige Oxydation im Körper annehmen. Die physiologischen Verbrennungswerte dieser Substanzen sind also dieselben wie die bei direkter kalorimetrischer Bestimmung erhaltenen Werte. Die Endprodukte der Eiweißzersetzung sind nicht vollständig oxydiert und

---

[1]) Zit. nach *Köhler*, Beiträge zur Kenntnis der elementaren Zusammensetzung und Verbrennungswärme der Muskelsubstanz verschiedener Tiere. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **31**. S. 500 (1901).

[2]) *Frentzel* und *Schreuer*, Verbrennungswärme und physiologischer Nutzwert der Nährstoffe. III. Abhandlung: Der Nutzwert des Fleisches. Arch. f. (Anat. u.) Physiol. S. 282. Jg. **1902**. Die Angaben beziehen sich auf Versuch II. S. 319.

[3]) *Rubner*, Kalorimetrische Untersuchungen. Zeitschr. f. Biol. Bd. **21**. S. 297 (1885).

[4]) *Benedict*, The influence of inanition on metabolism. p. 37, 50 (1907).

[5]) *Atwater* und *Benedict*, Metabolism of matter and energy in the human body. U. S. Dept. Agr., Office of Experiment Stations Buls. Nr. 136. p. 169 (1900—1902).

[6]) *Zuntz*, Über den Stoffverbrauch des Hundes bei Muskelarbeit. Arch. f. ges. Physiol. Bd. **68**. S. 201, 203 (1897); vgl. *E. Pflüger*, Über Fleisch- und Fettmästung. Arch. f. ges. Physiol. Bd. **52**. S. 78 (1892).

der kalorimetrisch bestimmte Verbrennungswert des Eiweißes muß also um den Energieinhalt jener Produkte vermindert werden, um den physiologischen Nutzwert des umgesetzten Eiweißes zu erhalten. Bei den Berechnungen werden die folgenden Durchschnittszahlen, Kalorien pro Gramm Substanz, benutzt:

| Eiweiß | Fett | Kohlehydrate | |
|---|---|---|---|
| 4·1 | 9·3 | 4·1 | *Rubner*[1]) |
| 4·2 | 9·4 | 4·15 | *Tigerstedt*[2]). |

Jene Zahlen beziehen sich eigentlich auf die Hauptbestandteile der gewöhnlichen Nahrungsmittel und sind also von der Zusammensetzung der betreffenden Kost abhängig. Sie werden aber auch benutzt, um den Energieinhalt des Kotes und denjenigen des umgesetzten Körpermateriales zu berechnen. Die Anwendbarkeit dieser Standardzahlen wird dadurch bewiesen, daß man mittelst derselben bei der Berechnung des Energieumsatzes im Körper Resultate erhält, welche mit den direkten Beobachtungen der im Körper entwickelten Wärmemenge übereinstimmen. Solche Versuche wurden von *Rubner*[3]) 1894 ausgeführt. Später hat *Tigerstedt*[2]) die *Rubner*schen Standardzahlen etwas erhöht und die Zuverlässigkeit dieser Werte durch eine Berechnung des umfangreichen Materiales, welches die Versuche der amerikanischen Forscher *Atwater* und *Benedict*[4]) ergeben haben, geprüft.

Wenn man, wie *Atwater* und *Benedict,* die Verbrennungswärme der Kost und diejenige des Kotes und des Harnes in jedem Falle direkt bestimmt, braucht man nur mit den physikalischen Verbrennungswerten der Körpersubstanzen zu rechnen. Die genannten Forscher haben für die Körpersubstanzen folgende Durchschnittswerte berechnet:

| | | |
|---|---|---|
| Eiweiß . . . . . . . . . | 5·65 | Kal. |
| Fett (tier.) . . . . . . . | 9·50 | „ |
| „ (menschl.) . . . . | 9·54 | „ |
| Kohlehydrate . . . . . | 4·19 | „ |

## 3. Schema des Stoffwechsels.

Den Umsatz oder Stoffverbrauch im Körper kann man in energetischer Beziehung auf zwei Kategorien verteilen. In den Geweben findet stetig eine Zersetzung statt, die man mit dem Ausdrucke die Verbrennung im Körper bezeichnet hat. Die potentielle Energie des zerfallenden Materiales wird in Wärme und äußere Arbeit übergeführt. Die ausgeschiedenen Zerfallsprodukte, Kohlensäure, Wasser und die organischen Bestandteile des Harnes, stellen die eigentlichen Endprodukte des Stoffwechsels, die „Verbrennungsprodukte" dar.

Eine andere Art Substanzverlust erleidet der Körper durch die Reste der Verdauungssäfte und andere Absonderungsprodukte im Kote, durch

[1]) *Rubner,* a. a. O. S. 370 (1885).

[2]) *Tigerstedt, Nagels* Handbuch. Bd. **1.** S. 370 (1906).

[3]) *Rubner,* Die Quelle der tierischen Wärme. Zeitschr. f. Biol. Bd. **30.** S. 73 (1894).

[4]) *Atwater* und *Benedict,* U. S. Dept. Agr., Office of Experiment Stations Buls. Nr. 63, 69, 109.

die Milchabsonderung, durch Schleim, Menstrualblut, Sperma, abgestoßene Epithelzellen, Haarausfall usw. Jene Ausgaben, welche Stoffe enthalten, die in bezug auf Zusammensetzung und Verbrennungswärme von den eigentlichen Endprodukten des Stoffwechsels erheblich abweichen und den Substanzen des Körpermateriales näher stehen, stellen zwar einen Verlust an potentieller Energie dar, entsprechen aber nicht, wie die Verbrennungsprodukte, einer Umsetzung von potentieller Energie in aktuelle. Beim Bilanzaufstellen können wir diesen Posten als „Substanzverlust ohne Verbrennung" oder einfach „Substanzverlust" bezeichnen.

Es werden außerdem vom Körper Substanzen abgegeben, die sich am Stoffwechsel nicht beteiligt haben: die unresorbierten Reste der Nahrung im Kote, diejenigen Stoffe, welche aus dem Darme zwar aufgenommen worden sind, aber in unveränderter Form in den Exkreten wiedergefunden werden. Diese Stoffe können einfach als „Abfall" von der Zufuhr abgezogen werden.

Wir können somit den Stoffwechsel durch die folgende Bilanzaufstellung wiedergeben. Für jeden Posten werden teils die Substanzgruppen Eiweiß, Fett, Kohlehydrate, teils der entsprechende Energieinhalt verzeichnet.

| | | Eiweiß Gramm | Fett Gramm | Kohlehydrat Gramm | Energie Kalorien |
|---|---|---|---|---|---|
| **Zufuhr, brutto,** Nahrung | | (Eiw.)roh | (Fett)roh | (Kh.)roh | (Kal.)roh |
| **Abfall,** Nahrungsreste im Kote | | (Eiw.)Abf. | (Fett)Abf. | (Kh.)Abf. | (Kal.)Abf. |
| | **Zufuhr, netto** | (Eiw.)rein | (Fett)rein | (Kh.)rein | (Kal.)rein |
| **Umsatz** | **Verbrennung:** Aus Endprodukten des Stoffwechsels abgeleitet | (Eiw.)Zerf. | (Fett)Zerf. | (Kh.)Zerf. | (Kal.) |
| | **Substanzverlust** ohne Verbrennung: Reste der Verdauungssäfte, Milch, Schleim etc. | (Eiw.)Verl. | (Fett)Verl. | (Kh.)Verl. | (Kal.)Verl. |
| | **Bilanz** des Körpermateriales | (Eiw.)Bil. | (Fett)Bil. | (Kh.)Bil. | (Kal.)Bil. |

Aus praktischen Gründen rechnet man meistens die Werte der Verdauungssäfte im Kote als „Abfall" zusammen mit dem Rückstande der Kost (siehe unten). Das obige Schema wird außerdem dadurch vereinfacht, daß der Posten „Substanzverlust ohne Verbrennung" in den meisten Fällen vernachlässigt werden kann. Die Milchabsonderung kommt nur bei besonderen Versuchen in Betracht. Der Substanzverlust durch Schleim, Epidermisschuppen etc. tritt gegen denjenigen durch die „Verbrennung" ganz zurück.

Es muß darauf aufmerksam gemacht werden, daß, wenn man den Energieinhalt des Eiweißes nach dem kalorimetrischen Verbrennungswerte rechnet, die Verbrennungswärme des Harnes von dem berechneten Energiebetrage des Postens „Verbrennung" abgezogen werden muß, damit man die tatsächliche Wärmeentwicklung im Körper erhält.

Wenn man den direkt bestimmten Energieinhalt der Kost bzw. denjenigen des Kotes und des Harnes in die Rechnung einführt, so wird die Energiebilanz des Körpers folgendermaßen aufgestellt:

| | |
|---|---|
| Zufuhr, brutto | (Kal.)Kost |
| Verlust | (Kal.)Kot + (Kal.)Harn |
| Zufuhr, netto | (Kal.)netto |
| Wärme und äußere Arbeit | (Kal.) |
| Bilanz des Energievorrates | (Kal.)Bil. |

### 4. Die einzelnen Posten im Stoffwechsel.

*A.* Die Nahrung wird entweder in Form von chemischen Substanzen von bekannter Zusammensetzung, z. B. bestimmten Eiweißkörpern, Zuckerarten usw., zugeführt oder als eine gemischte Kost, welche aus den gewöhnlichen Nahrungsmitteln besteht. Im letzteren Falle kann man die einzelnen Substanzen meistens nicht bestimmen. Man begnügt sich damit, sie folgendermaßen auf die oben genannten Hauptgruppen zu verteilen. Man bestimmt den Stickstoff (N), den Ätherextrakt, die Trockensubstanz und die Asche und berechnet dann

*a)* als Eiweiß: das Produkt $6{\cdot}25 \times (N)$, indem man annimmt, daß die ganze Stickstoffmenge aus Eiweißkörpern stammt, und zwar mit einem durchschnittlichen Stickstoffgehalt von 16%;
*b)* als Fett: den Ätherextrakt;
*c)* als Kohlehydrat die Differenz: Trockensubstanz — {Eiweiß + Fett + Asche}.

Nachdem die Zufuhr auf die drei Gruppen von Nahrungsstoffen verteilt worden ist, berechnet man mittelst der oben angeführten Koeffizienten den Verbrennungswert der Kost. Meistens bedient man sich der *Rubner*schen Standardzahlen oder man berechnet Durchschnittszahlen für die betreffende Untersuchung.

Bei dieser Berechnung verfährt man in folgender Weise: Man bestimmt den prozentuellen Anteil der betreffenden Nahrungsmittel in der Eiweiß- bzw. Fett- und Kohlehydratzufuhr (A). Aus den von *Stohmann, Berthelot, Rubner* und anderen ausgeführten Bestimmungen der Verbrennungswärme verschiedener Eiweißkörper, Fettarten und Kohlehydrate entnimmt man diejenigen Werte (B), welche sich auf die in den betreffenden Nahrungsmitteln vorhandenen Nahrungsstoffe beziehen. Betreffs der Eiweißkörper wird die Verbrennungswärme auf einen durchschnittlichen Stickstoffgehalt von 16% umgerechnet. Die Berechnung wird dann nach dem folgenden Schema ausgeführt:

| Nahrungsstoff | Nahrungsmittel | A | B | A × B |
|---|---|---|---|---|
| Eiweiß: | Fleisch, Fisch etc. . . . . . . . . . . . | — | — | — |
| | Molkereiprodukte . . . . . . . . . . . . | — | — | — |
| | — — — — . . . . . . . . . . . . | — | — | — |
| | Summe . . | 100 | — | — |
| | Durchschnittlicher Verbrennungswert . . . | | — | |
| Fett: | Fleisch, Speck etc. . . . . . . . . . . . | — | — | — |
| | — — — — . . . . . . . . . . . . | — | — | — |
| | Summe . . | 100 | — | — |
| | Durchschnittlicher Verbrennungswert . . . | | — | |
| Kohlehydrate: | Molkereiprodukte . . . . . . . . . . . . | — | — | — |
| | Getreide . . . . . . . . . . . . . . . | — | — | — |
| | — — — — . . . . . . . . . . . . | — | — | — |
| | Summe . . | 100 | — | — |
| | Durchschnittlicher Verbrennungswert . . . | | — | |

Wir führen hier einige Durchschnittszahlen, welche in dieser Weise berechnet worden sind, an.

| | Verbrennungswert | | |
|---|---|---|---|
| | Eiweiß | Fett | Kohlehydrate |
| *Atwater*[1]), Vereinigte Staaten . . . . . . . . . | 5·67 | 9·40 | 4·12 |
| *Sundström*[2]), Finnland . . . . . . . . . . . . . | 5·65 | 9·32 | 4·15 |

Die oben angeführte Verteilung der Nahrungszufuhr schließt mehrere willkürliche Momente ein und läßt sich nicht bei den genaueren Bilanzberechnungen anwenden. In solchen Fällen muß man die Nahrungsmittel einer vollständigen Elementaranalyse unterwerfen. Die Zufuhr wird auf die einzelnen Grundstoffe verteilt. Der Energieinhalt der Kost wird mittelst Verbrennung in der kalorimetrischen Bombe direkt bestimmt.

*B.* Als Abfall werden in erster Linie die unresorbierten Nahrungsreste im Kote gerechnet. Wenn man Substanzen zuführt, welche in unveränderter Form in den Harn übergehen, z. B. Zucker in größeren Dosen, so werden die ausgeschiedenen Mengen meistens auch im Posten „Abfall" mitgerechnet und somit beim Bilanzaufstellen direkt von der Zufuhr abgezogen.

Der Kot wird in derselben Weise wie die Nahrung auf den Gehalt an Stickstoff, Ätherextrakt, Trockensubstanz und Asche untersucht. Bei genaueren Versuchen führt man außerdem eine vollständige Elementaranalyse aus und bestimmt direkt die Verbrennungswärme.

In bezug auf die tägliche Kotabgabe bei Menschen können wir die folgenden Angaben anführen:

| | N Gramm/Tag | C Gramm/Tag | Energie Kalorien/Tag |
|---|---|---|---|
| bei gemischter Kost[3]) . . . . . . | 1·6 | 12·9 | 144 |
| beim Hungern[4]) . . . . . . . . . | 0·13 | 1·08 | |

Da die C-Menge im Kote sehr gering ist, kann es unter Umständen genügen, sie aus dem N zu berechnen. Nach den Untersuchungen von *Atwater* und *Benedict*[5]) schwankt $\frac{C}{N}$ im Kote bei gemischter Kost zwischen 6·8 und 13·5 und beträgt im Mittel 9·2.

Gegen das Verfahren, den ganzen Kot als „Abfall" zu rechnen, hat man den Einwand erhoben, daß derselbe wenigstens bei gewöhnlicher Nahrung zum großen Teil dem Körper selbst entstammt. Wie oben erwähnt, sollte man eigentlich diesen Teil zu den „Substanzverlusten" rechnen. Es ist aber meistens unmöglich, die Reste der Verdauungssäfte von dem Rückstand der Kost zu scheiden. Nur unter besonderen

[1]) *Atwater*, Report of the *Storrs* Agricult. Experim. Station for 1899. p. 98.

[2]) *Sigfrid Sundström*, Untersuchungen über die Ernährung der Landbevölkerung in Finnland. Bidrag till kännedom af Finlands natur och folk. Utgifven af Finska Vetenskaps-Societeten. Heft 67. Nr. 1 (1908).

[3]) *Atwater* und *Benedict*, a. a. O. Bull. Nr. 136. p. 122.

[4]) *Johansson*, *Landergren*, *Sondén* und *Tigerstedt*, Beiträge zur Kenntnis des Stoffwechsels beim hungernden Menschen. Skand. Arch. f. Physiol. Bd. 7. S. 56 (1897).

[5]) *Atwater* und *Benedict*, a. a. O. Bull. Nr. 136. p. 207.

Verhältnissen, bei Hunger und bei reiner Fleischnahrung, kann man einen Kot erhalten, welcher als reines Stoffwechselprodukt betrachtet werden kann.

Da der Kotstickstoff von vielen Verfassern mit dem Harnstickstoff zusammen aufgeführt wird, ist es notwendig, die Frage von den Endprodukten der Eiweißverbrennung etwas näher zu erörtern.

Nach den Untersuchungen von *Frentzel* und *Schreuer*[1]) an Hunden enthält die Trockensubstanz des „Fleischkotes" 8·7% N, 12·6% Ätherextrakt und 20·7% Asche. Der Ätherextrakt — „Kotfett" — ist zwar kein Fett, hat aber annähernd dieselbe Zusammensetzung und Verbrennungswärme. Die fett- und aschefreie Substanz im Kote enthält 53% C, 7% H, 13% N, 27% O. Ihre Verbrennungswärme beträgt 45·4 Kal. pro Gramm N, also etwas mehr als das fett- und aschefreie Rindfleisch, welches man als Repräsentant des Körpereiweißes annimmt, dessen Verbrennungswärme etwa 34 Kal. pro Gramm N beträgt. Weder das „Kotfett" noch die stickstoffhaltige Substanz des Kotes können somit als Verbrennungsprodukte betrachtet werden. Ohne größere Fehler können dieselben mit dem unresorbierten Nahrungsreste als „Abfall" zusammengerechnet werden, was die Rechnung im hohen Grade vereinfacht und bei den meisten Versuchen mit gemischter Kost das einzig mögliche ist.

Für die Berechnung der Bilanzen des Körpermateriales ist es offenbar einerlei, ob man die betreffenden Substanzen als „Abfall" oder als „Stoffwechselprodukte" von dem Einkommen des Körpers abzieht. Für die Berechnung des Energieumsatzes im Körper ist es ebenfalls gleichgültig, vorausgesetzt, daß man den Energieinhalt jener Substanzen richtig schätzt. Wenn man für das Eiweiß in der Nahrung und die stickstoffhaltige Substanz im Kote den gleichen Verbrennungswert, etwa 34 Kal. pro Gamm N, annimmt, wird ein Energieverlust von (45—34=) 11 Kal. pro Gramm dem Körper entstammenden Kotstickstoffs vernachlässigt. Da die ganze Stickstoffmenge im Kote bei Menschen nur 1—2 *g* pro Tag beträgt, ist der betreffende Fehler ohne größere Bedeutung. Er wird übrigens ganz vermieden, wenn man die Verbrennungswärme des Kotes direkt bestimmt.

Es erübrigt noch, zu erörtern, ob man bei der Berechnung der Eiweißverbrennung im Körper den Kotstickstoff mit dem Harnstickstoff zusammenführen soll. Wie wir schon gesehen haben, kann die stickstoffhaltige Substanz im Kote schwerlich als ein Verbrennungsprodukt angesehen werden. Die Absonderung derselben steht mit der Nahrungsaufnahme im Zusammenhang, nicht aber mit der Verbrennung im Körper. Bei Hunger ist die Menge des Kotstickstoffs sehr gering, steigt aber bei Zufuhr von Nahrung bis aufs 10fache oder noch mehr, ohne daß der Harnstickstoff die entsprechenden Schwankungen aufweist. Es ist also unmöglich, für die Summe: Harnstickstoff + Kotstickstoff einen bestimmten „kalorischen Koeffizienten" (siehe unten) zu berechnen. 1 *g* Harnstickstoff

[1]) *Frentzel* und *Schreuer*, Verbrennungswärme und physiologischer Nutzwert der Nährstoffe. IV. Abhandlung: Die Zusammensetzung und der Energiewert des Fleischkotes. Arch. f. (Anat. u.) Physiol. Jg. **1903**. S. 460.

entspricht einer Wärmeentwicklung im Körper von etwa 26 Kal., 1 *g* dem Körper entstammender Kotstickstoff stellt dagegen einen Energieverlust von mindestens 11 Kal. dar.

Ebensowenig wie die Bestandteile der Milch können die vom Körper abgegebenen Substanzen im Kote als Verbrennungsprodukte angesehen werden, obwohl beide Stoffwechselprodukte sind. Man muß zwischen Eiweißumsatz und Eiweißverbrennung unterscheiden. Die erstere Größe wird durch die Summe Harnstickstoff + Kotstickstoff annähernd angegeben, die letztere ergibt sich aus dem Harnstickstoff allein.

Für manche Stoffe, besonders Calcium, Magnesium, Eisen, Phosphor, ist der Darm als Ausscheidungsorgan zu betrachten. Aber auch organische Stoffwechselprodukte werden, wie erwähnt, auf diesem Wege ausgeschieden. Diese kommen aber hauptsächlich beim Studium des intermediären Stoffwechsels in Betracht. Bei den gewöhnlichen Stoffwechselversuchen werden diese Stoffe von den Nahrungsresten nicht geschieden. Man nimmt für die stickstoffhaltige Substanz und für das Ätherextrakt im Kote dieselben Werte der Verbrennungswärme an wie für die entsprechenden Substanzen in der Nahrung. Der Fehler, der hierdurch entsteht, ist ohne Bedeutung und kann, wie oben erwähnt, vermieden werden, wenn man den Energieinhalt des Kotes direkt kalorimetrisch bestimmt.

*C.* Die Nettozufuhr erhält man als Differenz zwischen Zufuhr und Abfall, d. h. praktisch zwischen Kost und Kot. Mit Hilfe im voraus bestimmter Ausnützungskoeffizienten kann dieselbe auch berechnet werden. Die Koeffizienten sind aber unsicher, wenigstens wenn es sich um die einzelnen Nahrungsmittel handelt. Die Ausnützung eines Nahrungsmittels schwankt nämlich mit der Menge und der Mischung, in welcher es genommen wird. Am besten lassen sich die betreffenden Koeffizienten für bestimmte Kostzusammenstellungen berechnen.

Wir stellen hier einige Werte zusammen, welche sich auf die prozentuelle Ausnutzung der einzelnen Nahrungsstoffe, Asche und Energie der Arbeiterkost beziehen.

| | | Min. Prozent | Max. Prozent | Mittel Prozent |
|---|---|---|---|---|
| I[1]) | Eiweiß (Stickstoff) | 81·7 | 94·5 | 88·7 |
| | Fett (Ätherextrakt) | 86·6 | 98·6 | 94·6 |
| | Kohlehydrat | 94·3 | 98·9 | 97·6 |
| | Kalorien (berechnet) | 92·0 | 98·0 | 95·2 |
| II[2]) | Eiweiß (Stickstoff) | 75·6 | 90·6 | 84·4 |
| | Fett (Ätherextrakt) | 82·3 | 94·5 | 90·0 |
| | Kohlehydrate | 91·3 | 97·3 | 95·2 |
| | Asche | 68·8 | 88·1 | 78·6 |
| | Kalorien (dir. bestimmt) | 87·6 | 94·8 | 91·6 |
| | Trockensubstanz | 87·8 | 94·8 | 91·9 |

[1]) Die Beobachtungen beziehen sich auf 33 belgische Arbeiter. *A. Slosse* und *E. van de Weyer*, Étude analytique de l'alimentation d'un groupe de trente-trois ouvriers bruxellois. Mémoires couronnés et autres Mémoires, publiés par l'Académie royale de Médecine de Belgique. T. 19. fasc. 8 (1908).

[2]) 12 finnländische Arbeiter. *S. Sundström*, a. a. O.

Es mag darauf aufmerksam gemacht werden, daß der Verlust an Trockensubstanz im Kote sehr genau mit dem an potentieller Energie übereinstimmt *(Tigerstedt).*

Für die Ausnutzung der potentiellen Energie der Kost bei gemischter Nahrung fand *Rubner*[1]) den Wert 91·9%.

Die Nettozufuhr kann nicht exakt bestimmt werden, da man den Rückstand der Kost nicht von den Resten der Verdauungssäfte und von anderen Ausscheidungsprodukten im Kote scheiden kann. *Atwater* hat daher vorgeschlagen, statt der Nettozufuhr der Nahrungsstoffe die Nutzbarmachung (availability) der mit diesen Stoffen zugeführten potentiellen Energie zu berechnen. Für Fett und Kohlehydrat wird die Berechnung in der gleichen Weise wie oben ausgeführt. Für das Eiweiß wird die Energie des unoxydierten Materiales im Harne von der totalen Energie des zugeführten Eiweißes abgezogen. Die Nutzbarmachung der potentiellen Energie in der gesamten Kost ergibt sich, wenn man von der Verbrennungswärme der Kost diejenige des Kotes und des Harnes abzieht. Wir führen hier die von *Atwater* und *Benedict*[2]) erhaltenen Werte an:

| | Min. Prozent | Max. Prozent | Mittel Prozent |
|---|---|---|---|
| Eiweiß | 83·6 | 96·8 | 90·8 |
| Fett | 90·1 | 98·2 | 95·3 |
| Kohlehydrate | 93·7 | 98·9 | 97·6 |
| Asche | 44·4 | 80·4 | 71·9 |
| Kalorien | 88·5 | 94·4 | 91·6 |

*D.* Den Stoffverbrauch oder den Umsatz im Körper haben wir im obigen Schema auf zwei Posten verteilt: die „Verbrennung“ und der „Substanzverlust ohne Verbrennung“. Die Gesamtverbrennung im Körper kann direkt kalorimetrisch bestimmt werden. Die einzelnen Komponenten derselben können dagegen nur in indirekter Weise aus den Verbrennungsprodukten abgeleitet werden. Es handelt sich also bei den Stoffwechselversuchen darum, in den Ausgaben des Körpers jene Produkte zu bestimmen.

*E.* Die Bilanzen des Körpermateriales erhält man als Differenz zwischen „Nettozufuhr“ und „Umsatz“. Sie können auch, wie wir sehen werden, unabhängig von der Berechnung der Nettozufuhr abgeleitet werden. Wenn man die positiven Bilanzen — den Gewinn an Körpermaterial — von der Nettozufuhr abzieht, bzw. die negativen zu derselben addiert, erhält man in solchem Falle den „Umsatz“.

## 5. Verbrennungsprodukte.

Die Kohlensäure wird zum größten Teil durch die Lungen ausgeschieden. Die Kohlensäureabgabe durch die Haut beträgt beim Menschen 7—8 *g* pro 24 Stunden, steigt aber bei Schweißabsonderung bis auf das 3- oder

[1]) *Rubner,* Kalorim. Untersuchungen. Zeitschr. f. Biol. Bd. **21**. S. 379 (1885).
[2]) *Atwater* und *Benedict,* a. a. O. Bull. Nr. 136. S. 108.

4fache.[1]) Unter gewöhnlichen Verhältnissen beträgt also die Kohlensäureausscheidung durch die Haut kaum mehr als 1% der gesamten Menge und kann vernachlässigt werden. Bei den meisten Versuchsanordnungen wird sie zusammen mit der ausgeatmeten Kohlensäure bestimmt.

Das im Körper gebildete Wasser kann nur bei vollständigen Bilanzversuchen berechnet werden. (Siehe unten.)

Die stickstoffhaltigen Verbrennungsprodukte werden mit dem Harne ausgeschieden. Der Harnstickstoff gibt somit die Eiweißverbrennung im Körper an. Der Kotstickstoff darf, wie wir gesehen haben, in dieser Hinsicht nicht mit dem Harnstickstoff zusammengerechnet werden. Der Schweiß dagegen enthält wirkliche Endprodukte der Eiweißverbrennung (Harnstoff, Harnsäure). Ihre Menge ist meistens gering und kann vernachlässigt werden. Bei größerer Arbeitsleistung, besonders bei hoher Temperatur werden aber Stickstoffmengen (bis 1·4 *g* N pro Tag) in dieser Weise ausgeschieden, deren Vernachlässigung wenigstens bei Bilanzversuchen nicht unbeträchtliche Fehler herbeiführt.[2])

Außer dem Stickstoff wird bei genauen Stoffwechselversuchen auch der Kohlenstoff im Harne bestimmt. Ebenso gehört eine kalorimetrische Bestimmung des Energieinhaltes im Harne zu einem vollständigen Versuche. Bisweilen kann es genügend sein, diese Größe mittelst angenommenen Koeffizienten aus dem Stickstoff zu berechnen. Wir führen hier diejenigen Werte der Verhältnisse $\frac{C}{N}$ und $\frac{Kal}{N}$ im Harne an, welche aus den zahlreichen Versuchen von *Atwater* und *Benedict*[3]) an Menschen bei gemischter Kost hervorgegangen sind:

| | Mittel | Max. | Min. |
|---|---|---|---|
| $\frac{C}{N}$ . . . . . . . . . . . . . . . | 0·72 | 0·79 | 0·63 |
| $\frac{Kal}{N}$ . . . . . . . . . . . . . . . | 8·07 | 9·08 | 7·09 |

Es ist aber zu bemerken, daß diese Werte bei verschiedener Nahrung erhebliche Schwankungen darbieten.[4])

Bei Untersuchungen des intermediären Stoffwechsels kommen die Bestimmungen von Ammoniak, Purinkörpern, Kreatinin, Acetonkörpern u. a. in Betracht. Die Acetonbestimmung hat eine besondere Bedeutung als In-

---

[1]) *Schierbeck,* Die Kohlensäure- und Wasserausscheidung der Haut bei Temperaturen zwischen 30° und 39°. Arch. f. (Anat. u.) Physiol. Jg. **1893**. S. 116; Arch. f. Hygiene. Bd. **16**. S. 218. — *v. Willebrand,* Über die Kohlensäure- und Wasserausscheidung durch die Haut des Menschen. Skand. Arch. f. Physiol. Bd. **13**. S. 337 (1902).

[2]) *Argutinsky,* Versuche über die Stickstoffausscheidung durch den Schweiß bei gesteigerter Schweißabsonderung. *Pflügers* Arch. Bd. **46**. S. 594. — *Eijkman,* Über den Eiweißbedarf der Tropenbewohner, nebst Bemerkungen über den Einfluß des Tropenklimas auf den Gesamtstoffwechsel und die Wärmeproduktion. Arch. f. pathol. Anat. Bd. **131**. S. 167. — *Atwater* und *Benedict,* a. a. O. Bull. Nr. 136. S. 118.

[3]) *Atwater* und *Benedict,* a. a. O. Bull. Nr. 136. S. 223.

[4]) *Tangl,* Beitrag zur Kenntnis des Energiegehaltes des menschlichen Harnes. Arch. f. (Anat. u.) Physiol. Jg. **1899**. Suppl. S. 251.

dikator einer mangelnden Kohlehydratverbrennung im Körper. Für Fragen betreffend die Eiweißumsetzung können unter Umständen Bestimmungen der S- und P-Ausscheidung von Gewicht sein.

Für die Berechnung der Verbrennung im Körper ist es notwendig, nicht nur die Menge der Verbrennungsprodukte, sondern auch die Menge des verbrauchten Sauerstoffs zu kennen. Zu einem vollständigen Stoffwechselversuche gehört daher auch die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme des Körpers.

### 6. Bilanzen des Körpermateriales.

Die Bilanzen des Körpermateriales sind im obigen Schema als Differenzen zwischen der Nahrungszufuhr netto und dem berechneten Umsatze dargestellt. In direkter Weise lassen sich aber Bilanzen aus dem gesamten Einkommen und den Ausgaben des Körpers ableiten. Dieses Verfahren hat den Vorzug, daß es nicht so viele Annahmen betreffs der Umsetzungen im Körper einschließt wie die Berechnung der Verbrennung. Die Bilanzen können aber nicht direkt auf Körpersubstanzen, Eiweiß, Fett und Kohlehydrate, bezogen werden, sondern müssen nach Grundstoffen aufgestellt werden. Einen vollständigen Bilanzversuch können wir folgendermaßen darstellen. Die direkt bestimmbaren Größen sind mit dem Zeichen — angegeben.

| | N | C | H | O | S | P | Eiweiß | Fett | Kohleh. | Wasser | Asche |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Einkommen: | | | | | | | | | | | |
| Kost | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Wasser | | | — | — | | | | | | — | |
| Sauerstoff | | | | — | | | | | | | |
| Ausgaben: | | | | | | | | | | | |
| Kot | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Schweiß, Milch, Schleim etc. | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Harn | — | — | — | — | — | — | | | | — | — |
| Kohlensäure | | — | | — | | | | | | | |
| Wasserdampf | | | — | — | | | | | | — | |
| Bilanz | — | — | — | — | — | — | | | | | — |

Aus dem betreffenden Versuche gehen also direkt die N-, C- usw. Bilanzen hervor. Aus diesen kann man, wie oben erwähnt, die entsprechenden Mengen der Körpersubstanzen berechnen.

Durch Bilanzversuche erfährt man, ob der Körper mit einer gewissen Kost oder unter dem Einflusse eines gewissen Faktors sich im stofflichen Gleichgewicht befindet. Wie wir unten sehen werden, kann man auch bei Kenntnis der betreffenden Bilanzen des Körpermateriales die Größe des Umsatzes aus der Nahrungszufuhr berechnen. Meistens begnügt man sich, die N- und C-Bilanzen zu bestimmen. In einigen Fällen kann es genügen, statt den Kohlenstoff im Kote und im Harne direkt zu bestimmen, die Mengen desselben mittelst den oben erwähnten Koeffizienten $\frac{C}{N}$ aus den betreffenden Stickstoffmengen zu berechnen.

Die Dauer eines Bilanzversuches darf nicht zu kurz genommen werden, damit die Zufuhr und die Ausgaben einander entsprechen mögen. Um diese Forderung zu erfüllen, müssen die in der Nahrung enthaltenen Stoffe vor dem Ende des Versuches aus dem Darme aufgenommen bzw. mit dem Kote ausgeschieden werden. Die Aufnahme der Verdauungsprodukte bewirkt meistens eine Steigerung des respiratorischen Gaswechsels und der N-Ausscheidung mit dem Harne. Es wird auch vorausgesetzt, daß diese Steigerungen während des Versuches vollständig abklingen. Meistens ist eine Dauer von 24 Stunden genügend. Wenn es sich jedoch darum handelt, den auf eine bestimmte Nahrung treffenden Kot zu erhalten, nimmt der Versuch mehrere Tage in Anspruch.

### 7. Umsatz und Verbrennung im Körper.

Unter Umständen muß man, wie wir oben gesehen haben, zwischen dem „Umsatze" und der „Verbrennung" scheiden. Meistens aber kann der Unterschied — „Substanzverlust ohne Verbrennung" — vernachlässigt werden. Wir können also die Prinzipien, jene Größen zu bestimmen, gemeinsam behandeln.

Die Gesamtverbrennung im Körper läßt sich auf drei Wegen verfolgen:

1. Direkt, indem man die vom Körper abgegebene Wärmemenge und die geleistete äußere Arbeit mißt;

2. indirekt aus der Nettozufuhr und den Bilanzen des Körpermateriales;

3. indirekt aus den Endprodukten des Stoffwechsels — den Verbrennungsprodukten — und dem entsprechenden Sauerstoffverbrauche.

Die direkte Methode gibt nur die Gesamtverbrennung. Bei den indirekten wird die Verbrennung bzw. der Umsatz auch auf die verschiedenen Substanzgruppen Eiweiß, Fett und Kohlehydrate verteilt.

Die indirekten Methoden gehen von gewissen Voraussetzungen aus. Man nimmt an, daß die einzelnen Stoffe in einer gewissen Reihenfolge verbrannt werden, die Kohlehydrate vor dem Fette, die zugeführte Nahrung vor dem Körpermateriale. Es wird weiter vorausgesetzt, daß die synthetischen Prozesse im Körper als intermediäre Stufen der Verbrennung betrachtet werden können und daß also sämtliche Endprodukte des Stoffwechsels, welche in den Ausgaben des Körpers vorkommen, auf die Verbrennung im Körper bezogen werden können. Man nimmt schlechthin an, daß der gesamte Stoffwechsel auf die drei Komponenten Eiweiß-, Fett- und Kohlehydratverbrennung verteilt werden kann.[1])

Aus der angenommenen durchschnittlichen Zusammensetzung der Fette bzw. derjenigen der Kohlehydrate lassen sich die bei vollständiger

[1]) Bei Zufuhr von Alkohol kommt die vollständige Oxydation desselben hinzu.

Oxydation entstehenden Mengen Kohlensäure und Wasser nebst dem entsprechenden Sauerstoffverbrauche pro Gramm oxydierte Substanz berechnen. Betreffend das Eiweiß kann man eine Spaltung in einem stickstoffhaltigen und einem stickstofffreien Teil annehmen. Der erstere geht in den Harn über, der letztere wird ähnlich wie die Fette und die Kohlehydrate vollständig oxydiert. Die Größe der Eiweißverbrennung ergibt sich aus dem Harnstickstoff. Die stickstofffreien Oxydationsprodukte nebst dem Sauerstoffverbrauche pro Gramm zersetztes Eiweiß lassen sich aus dem erwähnten „stickstofffreien Rest" des Eiweißes ableiten.

Von diesen Annahmen ausgehend, hat man gewisse Koeffizienten bestimmt, mittelst welcher man in den einzelnen Fällen die Größe der Eiweiß-, Fett- und Kohlehydratverbrennung berechnen kann.

Die Berechtigung jener Voraussetzungen und die Anwendbarkeit der betreffenden Konstanten läßt sich dadurch prüfen, daß man gleichzeitig den Energieumsatz nach der direkten und einer der indirekten Methoden bestimmt.

Die Methode, die Verbrennung aus der Zufuhr zu berechnen, gründet sich darauf, daß die aus dem Darme aufgenommenen Stoffe zunächst das verbrauchte Material ersetzten. Durch die Bilanzen des Körpermateriales erfährt man, um wie viel die Zufuhr (netto) größer oder geringer ist als der Verbrauch, d. h. als der zu bestimmende Umsatz. Die Methode gibt also den ganzen Umsatz, „Verbrennung" nebst „Substanzverlust ohne Verbrennung". Bei der Anwendung dieser Methode ist man auf längere Versuchsperioden hingewiesen und kann nicht kurzdauernde Schwankungen der Verbrennung bestimmen.

Die Berechnung der Verbrennung aus den Endprodukten des Stoffwechsels und dem Sauerstoffverbrauche bietet den Vorzug, daß die Methode auch für kurze Beobachtungsperioden anwendbar ist. Der respiratorische Gaswechsel stellt sich fast unmittelbar nach den Schwankungen der Verbrennungsprozesse im Körper ein. Die Stickstoffausscheidung mit dem Harne ist in bezug auf jene Prozesse gewissermaßen zeitlich verschoben und gibt die Schwankungen der Eiweißverbrennung weniger treu wieder. Die Berechnung der Gesamtverbrennung wird aber, wie wir unten sehen werden, von der Größe der Stickstoffausscheidung verhältnismäßig wenig beeinflußt. Diese Methode gibt, wie die direkte, nur die Verbrennung. Die „Substanzverluste ohne Verbrennung" kommen also nicht in Betracht.

Bei der Anwendung der indirekten Methoden wird oft ein Teil der Verbrennung, z. B. derjenige der Kohlehydrate aus der Zufuhr, der andere Teil aus den Endprodukten berechnet.

## II. Koeffizienten der Eiweiß-, Fett- und Kohlehydratverbrennung.

Wie oben erwähnt, hat man für die Verbrennung der drei Hauptgruppen des Nahrungs- und Körpermateriales Durchschnittswerte der Kohlensäureabgabe bzw. des Sauerstoffverbrauchs — Gramm oder Liter pro Gramm

zersetzte Substanz — berechnet. Für die Eiweißverbrennung kommt die Stickstoffausscheidung mit dem Harne hinzu. Diese Werte können mit den physiologischen Verbrennungswerten zusammengestellt werden. Man erhält in dieser Weise die sogenannten kalorischen Koeffizienten, d. h. die Wärmeentwicklung im Körper pro Gramm oder Liter aufgenommenen Sauerstoffs bzw. pro Gramm oder Liter ausgeschiedener Kohlensäure oder pro Gramm Kohlenstoff darin. Die betreffenden Koeffizienten werden für reine Eiweiß- bzw. Fett- und Kohlehydratverbrennung berechnet. Bei der Eiweißverbrennung wird außerdem die Wärmeentwicklung pro Gramm Harnstickstoff berechnet.

*Atwater* und *Benedict* bezeichnen als Thermalquotienten die Kohlensäureabgabe bzw. die Sauerstoffaufnahme pro 100 Kalorien.

Unter den Koeffizienten, welche bei Berechnungen betreffend die Verbrennung im Körper zur Anwendung kommen, sind auch die respiratorischen Quotienten bei reiner Eiweiß- bzw. Fett- und Kohlehydratverbrennung zu rechnen.

## 1. Die Koeffizienten der Eiweißverbrennung.

Wir können von der Annahme ausgehen, daß sämtliche stickstoffhaltigen Endprodukte der Eiweißzersetzung in den Harn übergehen. Es ist mehrmals festgestellt, daß kein Stickstoff durch die Lungen ausgeschieden wird. Der im Schweiß enthaltene Stickstoff kann meistens vernachlässigt werden. Von mehreren Verfassern wird zwar ein Teil von den im Kote enthaltenen Stoffen zusammen mit den organischen Harnbestandteilen gerechnet. Wie oben erwähnt, sind aber diese Stoffe nicht als Endprodukte des Stoffwechsels zu betrachten. Derjenige Kotstickstoff, der dem Körper entstammt, wird hauptsächlich mit den Verdauungssäften abgesondert. Die Berechnung der Verbrennung aus den Verbrennungsprodukten bezieht sich gewöhnlich auf kurze Beobachtungsperioden. Eigentlich sollte man also nur die auf die betreffende Beobachtungsperiode fallenden Stoffwechselprodukte berücksichtigen. Wenn die Beobachtungsperiode außerhalb der Verdauungsperiode fällt, gibt es keinen Grund, die Verdauungssäfte in die Rechnung hineinzuziehen, selbst wenn diese als Endprodukte des Stoffwechsels zu betrachten wären. Diejenige Stickstoffmenge, welche beim Hungern mit dem Kote ausgeschieden wird, ist sehr geringfügig und kann ebenfalls nicht als ein Endprodukt der Eiweißverbrennung angesehen werden.

Bei der Berechnung wird weiter vorausgesetzt, daß die organischen Bestandteile des Harnes ausschließlich aus dem zersetzten Eiweiß herrühren. Wenn man also die durchschnittliche Zusammensetzung des zerfallenden Eiweißes und diejenige der organischen Harnbestandteile kennt, ergibt sich unmittelbar, wie viel C, H, O pro Gramm zersetztes Eiweiß im „stickstofffreien Reste" des Eiweißes zu berechnen ist. Man erhält dann die Mengen Kohlensäure und Wasser, welche bei der Oxydation des „Restes" entstehen nebst dem entsprechenden Sauerstoffverbrauche — alles pro Gramm zersetztes Eiweiß berechnet.

Bei jener Berechnung sollte man eigentlich auch den Schwefel des Eiweißes in Betracht nehmen, da es einen Teil von dem Sauerstoff des Restes beansprucht. Es ist aber zu bemerken, daß ein großer und unberechenbarer Teil des Schwefels als „neutraler Schwefel", also in nicht oxydierter Form mit dem Harne ausgeschieden wird (*Pflüger*[1]). In Erwägung der übrigen Unsicherheiten der Berechnung ist die Vernachlässigung des Schwefels ohne Belang.

Wir teilen hier einige Zahlen mit, welche in der oben angegebenen Weise abgeleitet worden sind und welche somit die Eiweißverbrennung im Körper in schematischer Weise wiedergeben.

Sämtliche Werte sind auf 1 *g* aschefreie Substanz bezogen, um miteinander vergleichbar zu werden. Die Reihen 1 und 2 stellen die von *Zuntz*[2]) und *Pflüger*[3]) ausgeführten Berechnungen dar, denen die Untersuchungen und Analysen von *Rubner*[4]) und *Stohmann* zugrunde liegen. Die Reihe 3 ist vom Verfasser berechnet. Dieselbe bezieht sich auf die gleichen Fleisch- und Harnanalysen wie die Reihe 2. Es ist aber angenommen, daß bei der Eiweißverbrennung im Körper die stickstoffhaltigen Endprodukte ausschließlich in den Harn übergehen. Die Reihe 4 enthält die Ergebnisse des Versuches II in den von *Frentzel* und *Schreuer*[5]) mitgeteilten Untersuchungen. Die Reihe 5 ist aus den Ergebnissen der zahlreichen Versuche von *Atwater* und *Benedict*[6]) mit gemischter Kost berechnet. Für das zersetzte „Nahrungseiweiß" ist die oben angeführte Zusammensetzung 53% C, 7% H, 16% N, 23% O und 1% S angenommen. Wie bei der Reihe 3 wird angenommen, daß der Harn sämtliche stickstoffhaltigen Endprodukte der Eiweißverbrennung enthält. Die Oxydation von Schwefel ist nicht berücksichtigt.

1 *g* im Körper zersetztes Eiweiß (aschefrei) liefert:

| Nr. | im „N-freien" Reste C Gramm | H Gramm | O Gramm | $CO_2$-Abgabe Gramm | Liter | $O_2$-Verbrauch Gramm | Liter | Resp.-Quotient | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 . . . | 0·415 | 0·049 | 0·100 | 1·52 | 0·77 | 1·39 | 0·97 | 0·79 | *Zuntz* |
| 2 . . . | 0·408 | 0·045 | 0·123 | 1·49 | 0·76 | 1·32 | 0·92 | 0·82 | *Pflüger* |
| 3 . . . | 0·416 | 0·046 | 0·126 | 1·53 | 0·78 | 1·35 | 0·94 | 0·82 | Verf. |
| 4 . . . | 0·415 | 0·045 | 0·100 | 1·52 | 0·77 | 1·37 | 0·96 | 0·81 | *Frentzel* |
| 5 . . . | 0·415 | 0·038 | 0·058 | 1·52 | 0·77 | 1·35 | 0·95 | 0·82 | Verf. |

Aus den obigen Zahlen ergibt sich pro Gramm N im Harne:

| Nr. | C im „N-freien" Reste Gramm | $CO_2$-Abgabe Gramm | Liter | $O_2$-Verbrauch Gramm | Liter | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 . . . . . . | 2·58 | 9·45 | 4·81 | 8·67 | 6·06 | *Zuntz* |
| 2 . . . . . . | 2·53 | 9·28 | 4·72 | 8·21 | 5·75 | *Pflüger* |
| 3 . . . . . . | 2·54 | 9·33 | 4·74 | 8·26 | 5·77 | Verf. |
| 4 . . . . . . | 2·48 | 9·10 | 4·63 | 8·17 | 5·71 | *Frentzel* |
| 5 . . . . . . | 2·59 | 9·51 | 4·84 | 8·46 | 5·91 | Verf. |

Die in der obigen Zusammenstellung mitgeteilten Zahlen sind auf die zweite Dezimalstelle abgerundet. Man kann die schematische Eiweißverbrennung im Körper nicht mit größerer Genauigkeit angeben.

---

[1]) *Pflüger*, Unsere Kenntnisse über den Kraftwert des Fleisches und der Eiweißstoffe. Arch. f. ges. Physiol. Bd. **79**. S. 575 (1900).

[2]) *Zuntz*, Arch. f. ges. Physiol. Bd. **68**. S. 203 (1897).

[3]) *Pflüger*, Arch. f. ges. Physiol. Bd. **79**. S. 570 (1900).

[4]) *Rubner*, Zeitschr. f. Biol. Bd. **21**. S. 250 (1885).

[5]) *Frentzel* und *Schreuer*, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. Jg. **1902**. S. 319.

[6]) *Atwater* und *Benedict*, Bull. Nr. 136. p. 169, 222.

Wie oben erwähnt, ist es prinzipiell am richtigsten, die stickstoffhaltigen Produkte im Kote ganz aus der Rechnung zu lassen. Die Reihen 3 und 5 sind in dieser Weise berechnet worden. Wenn man indessen, wie in den übrigen Reihen, jene Produkte in die Rechnung hineinzieht, so werden die berechneten Werte der Kohlensäureabgabe und des Sauerstoffverbrauches dadurch nur sehr wenig beeinflußt.

Es erübrigt noch die oben abgeleiteten Zahlen mit den entsprechenden Verbrennungswerten des Eiweißes zusammenzustellen. Die erste Ableitung des physiologischen Nutzwertes des Eiweißes wurde von *Rubner* (1885) gemacht. Er ging von der kalorimetrisch bestimmten Verbrennungswärme der benutzten Präparate aus und zog den Energieinhalt des Harnes und denjenigen des Kotes davon ab. Zugleich führte er einige Korrekturen für die Quellung des Eiweißes und die Lösung der Harnbestandteile ein. Die betreffenden Versuche waren aber keine eigentlichen Bilanzversuche. Die Verteilung des Stickstoffs auf Harn und Kot wurde in indirekter Weise abgeleitet. Bei den von *Zuntz* und von *Pflüger* ausgeführten Berechnungen der *Rubner*schen Ergebnisse wurde das „Kotfett" von den übrigen Kotbestandteilen abgezogen. Die Korrekturen für die Quellungs- und Lösungswärme wurden fortgelassen. Bei den Untersuchungen von *Frentzel* und *Schreuer* wurde die Verteilung des Stickstoffs auf Harn und Kot direkt bestimmt.

Bei allen oben erwähnten Berechnungen ist der „Nutzwert" des Eiweißes auf die umgesetzte Eiweißmenge bezogen. Bei den Berechnungen der Eiweißverbrennung im Körper kommt aber nur derjenige Teil des umgesetzten Eiweißes in Betracht, welcher verbrannt wird und aus dem Harnstickstoff berechnet werden kann. Die Eiweißverbrennung läßt sich nicht aus der Totalmenge des umgesetzten Eiweißes berechnen, weil das Verhältnis zwischen Kotstickstoff und Harnstickstoff sehr wechselnd ist, wie aus der folgenden Zusammenstellung hervorgeht:

| | $\frac{\text{N im Kote}}{\text{N im Harne}}$ | |
|---|---|---|
| Bei reiner Eiweißfütterung . . . . . . . | 0·014 | *Rubner* |
| „ „ Fleischfütterung . . . . . . | 0·016 | „ |
| „ „ „ . . . . . . | 0·022 | *Frentzel* |
| „ gemischter Kost . . . . . . . . . . | 0·092 | *Atwater* |

Bei gemischter Kost kann ein Teil vom Kotstickstoff ein Nahrungsrest sein. Es wird aber von mehreren Forschern hervorgehoben, daß bei gut verdaulicher Nahrung der Kot fast ausschließlich dem Körper selbst entstammt.

Die folgende Tabelle enthält teils die von verschiedenen Forschern abgeleiteten Nutzwerte des Eiweißes, teils die entsprechenden physiologischen Verbrennungswerte. Die letzteren hat der Verfasser in derjenigen Weise abgeleitet, daß von der kalorimetrischen Verbrennungswärme des Eiweißes, pro Gramm Stickstoff berechnet, diejenige des entsprechenden Harnes, ebenfalls pro Gramm Stickstoff berechnet, abgezogen worden

ist. Sowohl die Verbrennungswerte wie die Nutzwerte werden teils pro Gramm Stickstoff im Eiweiß, teils pro Gramm aschefreie Substanz angeführt.

| Umgesetztes Eiweiß | Verbrennungswärme (beob.) des zersetzten Eiweiß | Verbrennungswärme (beob.) des entspr. Harnes | Nutzwert (berechn.) pro Gramm N im Eiweiß | Nutzwert (berechn.) pro Gramm aschefreie Substanz | Physiologische Verbrennungswärme (berechn.) pro Gramm N im Eiweiß | Physiologische Verbrennungswärme (berechn.) pro Gramm aschefreie Substanz | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Extraktfreies Muskeleiweiß | 34·68 | 6·69 | [1]) 26·97 | [1]) 4·49 | 27·99 | 4·66 | *Rubner* |
| Körpersubstanz bei Hunger | 34·71 | 8·49 | [1]) 25·25 | [1]) 4·12 | 26·22 | 4·27 | *Rubner* |
| Fettfreies Muskelfleisch . | 34·71 | 7·45 | [1]) 26·28 | [1]) 4·28 | 27·26 | 4·44 | *Rubner* |
| " " . | 34·58 | 7·45 | 26·72 | [2]) 4·36 | 27·13 | 4·43 | *Zuntz* |
| " " . | 34·48 | 7·45 | 26·71 | [3]) 4·37 | 27·03 | 4·42 | *Pflüger* |
| " " . | 32·55 | 6·97 | 24·86 | 4·26 | 25·58 | 4·38 | *Frentzel* |
| Nahrungseiweiß [4]) . . . . | 33·31 | 8·06 | — | — | 27·25 | 4·36 | *Atwater* |

Wenn man den Nutzwert oder den physiologischen Verbrennungswert des Eiweißes auf die pro Gramm Eiweiß berechnete Kohlensäureabgabe bzw. Sauerstoffaufnahme bezieht, erhält man die kalorischen Koeffizienten. Die umgekehrten Werte sind die Thermalquotienten. Wir stellen hier die Werte jener Koeffizienten zusammen:

| | Kalorische Koeffizienten Kal. *g* C | Kal. *g* $CO_2$ | Kal. *g* $O_2$ | Kal. *l* $CO_2$ | Kal. *l* $O_2$ | Thermalquotienten $CO_2$ *g*/100 Kal. | $O_2$ *g* 100 Kal. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 10·52 | 2·87 | 3·13 | 5·64 | 4·47 | 34·8 | 31·9 | *Zuntz* |
| 2. | 10·72 | 2·92 | 3·31 | 5·75 | 4·73 | 34·2 | 30·3 | *Pflüger* |
| 3. | 10·62 | 2·90 | 3·27 | 5·70 | 4·68 | 34·5 | 30·5 | Verf. |
| 4. | 10·25 | 2·79 | 3·11 | 5·50 | 4·45 | 35·8 | 32·1 | *Frentzel* |
| 5. | 10·51 | 2·87 | 3·22 | 5·63 | 4·61 | 34·9 | 31·0 | Verf. |

Die Reihen 1, 2 und 4 beziehen sich auf die Nutzwerte, die Reihen 3 und 5 dagegen auf die Verbrennungswerte des Eiweißes. Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, ist der Unterschied zwischen Nutzwert und Verbrennungswert in praktischer Hinsicht von geringer Bedeutung. Die Daten, von welchen man bei Ableiten der fraglichen Koeffizienten ausgeht — die Zusammensetzung und Verbrennungswärme der verschiedenen Eiweißkörper und die Verbrennungswärme des Harnes — bieten so beträchtliche Schwankungen dar, daß es von untergeordneter Bedeutung ist, ob man die Berechnung nach dem Nutzwerte oder dem Verbrennungswerte einrichtet. Es hat natürlich keinen Sinn, die betreffenden Koeffizienten mit mehreren Dezimalstellen darzustellen.[5])

[1]) Ohne Korrektion für Quellungs- und Lösungswärme.

[2]) Pro Gramm aschehaltige Substanz 4·128 Kal.

[3]) Pro Gramm aschehaltige Substanz 4·137 Kal.

[4]) *Atwater* nimmt als Durchschnittswerte 5·65 Kal. und 16% N für das Eiweiß in der Nahrung an.

[5]) Beim Ableiten der Koeffizienten muß man natürlich mit mehr als zwei Dezimal stellen rechnen, was bei einer etwaigen Nachrechnung zu beachten ist.

### 2. Koeffizienten der Fett- und Kohlehydratverbrennung.

Die Kohlensäureabgabe, der Sauerstoffverbrauch und die kalorischen Koeffizienten lassen sich unmittelbar aus der Zusammensetzung und der Verbrennungswärme der betreffenden Substanzen ableiten. Für das tierische und das menschliche Fett nehmen wir die oben angeführten Durchschnittszahlen an, derer sich *Zuntz* und *Benedict* bei ihren Berechnungen bedient haben. Für Stärke, Glykogen, Glukose nehmen wir die von *Stohmann* und *Berthelot* angegebenen Werte der Verbrennungswärme an. Alkohol wird im Körper zum größten Teil verbrannt. Denjenigen Teil, der in den Ausscheidungen wiedergefunden wird, zieht man bei den Berechnungen direkt von der zugeführten Menge ab. Wenn nicht größere Mengen auf einmal zugeführt werden, kann man einen Verlust von 1·9% (*Atwater*[1]) berechnen.

Die in oben angegebener Weise abgeleiteten Zahlen stellen wir in den folgenden Tabellen zusammen:

| | Pro Gramm im Körper verbrannte Substanz | | | | Resp. Quotient | Verbrennungswärme |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $CO_2$-Abgabe | | $O_2$-Verbrauch | | | |
| | Gramm | Liter | Gramm | Liter | | |
| Tierisches Fett . . . . . | 2·81 | 1·43 | 2·89 | 2·02 | 0·707 | 9·46 |
| Menschliches Fett . . . . | 2·79 | 1·42 | 2·85 | 1·99 | 0·707 | 9·54 |
| Stärke, Glykogen . . . . | 1·630 | 0·829 | 1·185 | 0·829 | 1 | 4·18, 4·19 |
| Glukose . . . . . . . . . | 1·467 | 0·746 | 1·067 | 0·746 | 1 | 3·74 |
| Alkohol . . . . . . . . . | 1·91 | 0·97 | 2·09 | 1·46 | 0·67 | 7·03 |

Aus jenen Werten ergibt sich

| | Kal. $g$ C | Kal. $g$ $CO_2$ | Kal. $g$ $O_2$ | Kal. $l$ $CO_2$ | Kal. $l$ $O_2$ | $g$ $CO_2$ 100 Kal. | $g$ $O_2$ 100 Kal. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tierisches Fett . . | 12·36 | 3·37 | 3·28 | 6·63 | 4·69 | 29·7 | 30·5 |
| Menschliches Fett . | 12·54 | 3·42 | 3·35 | 6·72 | 4·78 | 29·2 | 29·9 |
| Glykogen . . . . . | 9·43 | 2·57 | 3·54 | 5·06 | 5·06 | 38·8 | 28·3 |
| Stärke . . . . . . | 9·41 | 2·57 | 3·53 | 5·05 | 5·05 | 39·0 | 28·3 |
| Glukose . . . . . | 9·36 | 2·55 | 3·51 | 5·02 | 5·02 | 39·2 | 28·5 |
| Alkohol . . . . . | 13·47 | 3·67 | 3·37 | 7·22 | 4·81 | 27·2 | 29·7 |

### 3. Die Zuverlässigkeit der kalorischen Koeffizienten.

Bei der Anwendung der oben angeführten Koeffizienten muß man besonders bei kurzdauernden Versuchen darauf Rücksicht nehmen, daß dieselben Durchschnittswerte sind. Man könnte natürlich für die einzelnen Eiweißkörper, Fettarten usw. die entsprechenden Koeffizienten ableiten. Es ist aber in dem einzelnen Falle nicht möglich, zu entscheiden, welche Substanzen im Körper zerfallen.[2]) Man muß sich daher immer mit Durchschnittswerten begnügen. Es ist daher auch nicht angemessen, die betreffenden Zahlen mit mehreren Dezimalstellen in die Rechnung hinein-

[1]) *Atwater* und *Benedict*, An experimental inquiry regarding the nutritive value of alcohol. National Academy of Science. Vol. 8. p. 235. Washington 1902.

[2]) Bei Versuchen längerer Dauer (Bilanzversuchen) gibt die Zufuhr nebst den Bilanzen des Körpermateriales den nötigen Aufschluß über den Zerfall im Körper

zuführen, da ein solches Verfahren den Anschein eines nicht zutreffenden Grades von Genauigkeit liefern würde.

Man muß sich auch erinnern, daß das Ableiten jener Koeffizienten von gewissen Voraussetzungen ausgeht. Es wird angenommen, daß die organischen Bestandteile des Harnes ausschließlich aus dem zerfallenen Eiweiß stammen. Bei diesem Zerfall nimmt man ein bestimmtes Verhältnis zwischen dem „N-freien Reste" und den mit dem Harne ausgeschiedenen Endprodukten des Eiweißes an.

Eine andere wichtige Voraussetzung ist die, daß die Summe der Umsetzungen im Körper während der Beobachtungsperiode sich als eine Summe von Eiweiß-, Fett- und Kohlehydratverbrennung darstellen läßt. Als Kriterium wird in dieser Hinsicht der respiratorische Quotient benutzt. Dieser darf nicht die Grenzen 0·7—1·0 überschreiten, welche der reinen Fett- bzw. der reinen Kohlehydratverbrennung entsprechen. Ein niedrigerer Wert deutet auf eine Glykogenbildung aus Eiweiß, eventuell aus Fett, ein höherer auf eine Fettbildung aus Kohlehydraten hin. Daß intermediäre Umsetzungen dieser Art im Körper stattfinden, geht aus mehreren Beobachtungen hervor, wenn man auch noch nicht den Verlauf näher kennt. Solange aber der Umfang der fraglichen Umsetzungen nicht größer ist als derjenige der Verbrennungsprozesse, hält sich der respiratorische Quotient innerhalb der erwähnten Grenzen. Man kann also die oben angeführte Voraussetzung in folgender Weise ausdrücken: Der Stand der Eiweiß-, bzw. der Fett- und der Kohlehydratvorräte im Körper darf nur durch Zufuhr und vollständige Verbrennung dieser Stoffe, nicht aber durch intermediäre Umsetzungen des Körpermateriales oder der zugeführten Nahrung geändert werden.

Unter den angeführten Voraussetzungen geht es aus dem respiratorischen Quotienten annähernd hervor, wie die Verbrennung sich auf die drei Substanzgruppen verteilt. Die oben mitgeteilten „Termalquotienten" *(Atwater)* geben die Größe der Kohlensäureabgabe bzw. diejenige der Sauerstoffaufnahme pro 100 Kalorien bei reiner Eiweiß-, reiner Fett- und reiner Kohlehydratverbrennung im Körper an. Wir nehmen für jene Koeffizienten die folgenden Durchschnittswerte an:

| Verbrennung von | *g* $CO_2$ 100 Kal. | *g* $O_2$ 100 Kal. | *l* $CO_2$ 100 Kal. | *l* $O_2$ 100 Kal. | Resp.-Quot. |
|---|---|---|---|---|---|
| Eiweiß | 34·7 | 30·7 | 17·6 | 21·5 | 0·82 |
| Fett | 29·5 | 30·3 | 15·0 | 21·2 | 0·708 |
| Kohlehydrate | 38·9 | 28·3 | 19·8 | 19·8 | 1 |

Mit Hilfe dieser Werte lassen sich die in der folgenden Tabelle zusammengestellten Zahlen ableiten, welche die Kohlehydratverbrennung in Prozent von der gesamten Verbrennung bei verschiedenen angenommenen Werten der Eiweißverbrennung angeben. In dieser Weise läßt sich somit die Verbrennung im Körper in schematischer Weise auf die drei Komponenten Eiweiß-, Fett- und Kohlehydratverbrennung verteilen. Es muß aber bemerkt werden, daß eine solche Verteilung für die Auffassung der einzelnen im Körper verlaufenden Prozesse meistens nur von untergeordneter Bedeutung ist.

| Resp.-Quot. | Angenommene Eiweißverbrennung in Prozenten | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 10 | 15 | 20 | 40 | 60 | 80 |
| | Berechnete Kohlehydratverbrennung in Prozenten | | | | | | |
| 0·99 | 97 | | | | | | |
| 0·97 | 90 | 87 | 85 | | | | |
| 0·95 | 84 | 80 | 79 | 77 | | | |
| 0·93 | 77 | 73 | 72 | 70 | | | |
| 0·91 | 71 | 66 | 65 | 63 | 55 | | |
| 0·89 | 64 | 60 | 58 | 57 | 49 | 41 | |
| 0·87 | 57 | 53 | 51 | 50 | 42 | 34 | |
| 0·85 | 50 | 47 | 45 | 43 | 35 | 27 | 19 |
| 0·83 | 43 | 40 | 38 | 36 | 28 | 20 | 12 |
| 0·81 | 36 | 33 | 31 | 29 | 20 | 13 | 5 |
| 0·79 | 29 | 26 | 24 | 21 | 13 | 6 | |
| 0·77 | 22 | 19 | 16 | 14 | 6 | | |
| 0·75 | 15 | 11 | 9 | 1 | 0 | | |
| 0·73 | 8 | 4 | 2 | 0 | | | |
| 0·71 | 1 | | | | | | |

## 4. Die Sauerstoffaufnahme und die Kohlensäureabgabe als Maß der Verbrennung im Körper.

Wie aus den oben zusammengestellten kalorischen Koeffizienten hervorgeht, bleibt die Sauerstoffaufnahme pro 100 Kal. ziemlich unverändert, auch wenn verschiedene Stoffe sich bei der Verbrennung beteiligen. Die Kohlensäureabgabe erweist dagegen in dieser Hinsicht beträchtliche Schwankungen. Setzen wir die Sauerstoffaufnahme bzw. die Kohlensäureabgabe bei Fettverbrennung gleich 100, erhalten wir:

| | Kohlensäureabgabe | Sauerstoffaufnahme |
|---|---|---|
| Eiweißverbrennung . . . . . . . . . . . | 117 | 101 |
| Fettverbrennung . . . . . . . . . . . . | 100 | 100 |
| Kohlehydratverbrennung . . . . . . . . | 132 | 93 |

Aus den Schwankungen der Sauerstoffaufnahme kann man also in annähernder Weise die Schwankungen der Verbrennung beurteilen, auch wenn die Beteiligung der verschiedenen Stoffe an der Verbrennung etwas wechselt. Die Kohlensäureabgabe dagegen kann in dieser Hinsicht als Maß benutzt werden, nur wenn die Zusammensetzung des zerfallenden Materiales unverändert bleibt.

Es hat sich aber mehrmals erwiesen, daß die Kohlensäureabgabe eines Menschen pro Stunde gerechnet, im nüchternen Zustande und bei vollständiger Muskelruhe nur sehr geringe Schwankungen darbietet.[1] Daraus kann man schließen, daß die einzelnen Stoffe sich in sehr konstanten Proportionen an der Verbrennung unter jenen Umständen be-

[1]) *Johansson*, Über die Tagesschwankungen des Stoffwechsels und der Körpertemperatur in nüchternem Zustande und vollständiger Muskelruhe. Skand. Arch. f. Physiol. Bd. 8. S. 85 (1898).

teiligen. Diese Verbrennung hat *Magnus-Levy*[1]) mit dem sehr passenden Ausdrucke Grundumsatz bezeichnet. Der nüchterne Zustand, welcher von dem Hungerzustand genau geschieden werden muß, tritt ein, sobald der Einfluß der letzten Mahlzeit abgeklungen ist.

Es hat sich weiter erwiesen, daß diejenige Kohlensäureabgabe, welche einer bestimmten Muskeltätigkeit entspricht, sich zu der Kohlensäureabgabe des Grundumsatzes einfach addiert.[2]) Das gleiche ist der Fall betreffs derjenigen Kohlensäureabgabe, welche einer gewissen Zufuhr aus dem Darme entspricht. Wenn eine gewisse Muskeltätigkeit und eine gewisse Zufuhr aus dem Darme gleichzeitig stattfinden, addieren sich die beiden entsprechenden Kohlensäuremengen, unabhängig voneinander, zu der Kohlensäureabgabe des Grundumsatzes.[3]) Wenn man also von der Verbrennung im Körper im gewöhnlichen nüchternen Zustande und bei vollständiger, „vorsätzlicher" Muskelruhe — dem Grundumsatze — ausgeht, gibt die Steigerung der Kohlensäureabgabe die Intensität der chemischen Prozesse an, welche von jeweiliger Muskelarbeit oder Nahrungszufuhr bedingt sind.

Bei Versuchen an Menschen ist die betreffende Versuchsanordnung leicht herzustellen. Bei Tierversuchen kommt aber die Komplikation hinzu, daß die Muskeltätigkeit des betreffenden Versuchsindividuums in unberechenbarer Weise die Ergebnisse beeinflußt.

Wie oben erwähnt, eignen sich die Bilanzversuche nicht, um kurzdauernde Schwankungen der Verbrennung zu studieren. Man ist darauf angewiesen, die Ausscheidung der Endprodukte des Stoffwechsels und den Sauerstoffverbrauch als Maß der Intensität der betreffenden Prozesse zu benutzen. Wenn es sich darum handelt, jene Schwankungen in Energiemaß auszudrücken, ist der Sauerstoffverbrauch der zuverlässigste Indikator. Wir müssen uns aber erinnern, daß dieses Maß nur der Summe der einzelnen Prozesse im Körper entspricht. Unter diesen Prozessen gibt es solche, welche im gesamten Energieumsatze nur eine untergeordnete Rolle spielen und also den Sauerstoffverbrauch sehr wenig beeinflussen. Ein Teil dieser Prozesse, z. B. diejenigen, welche mit der ersten Umsetzung der aus dem Darme aufgenommenen Nahrung in Zusammenhang stehen, geben sich dagegen durch die Kohlensäureabgabe und die Stickstoffausscheidung mit dem Harne sehr deutlich zu erkennen. Für das Studium des intermediären Stoffwechsels haben also diese Ausscheidungen, wie z. B. diejenige der Acetonkörper, der Harnsäure usw. eine große Bedeutung, obgleich man den Betrag dieser Ausscheidungen nicht in Energiemaß umrechnen kann.

---

[1]) *Magnus-Levy, v. Noordens* Handbuch. Bd. **1**. S. 222 (1906).

[2]) *Johansson,* Untersuchungen über die Kohlensäureabgabe bei Muskeltätigkeit. Skand. Arch. f. Physiol. Bd. **11**. S. 305 (1901).

[3]) *Johansson* und *Koraen,* Wie wird die Kohlensäureabgabe bei Muskelarbeit von der Nahrungszufuhr beeinflußt? Skand. Arch. f. Physiol. Bd. **13**. S. 251 (1902). — *Johansson,* Untersuchungen über den Kohlehydratstoffwechsel. Skand. Arch. f. Physiol. Bd. **21**. S. 1 (1908). — *A. Gigon,* Über den Einfluß von Eiweiß- und Kohlehydratzufuhr auf den Stoffwechsel. Skand. Arch. f. Physiol. Bd. **21**. S. 351 (1908).

## III. Versuchsanordnungen.

Oben haben wir ein allgemeines Schema des Stoffwechsels dargestellt. Wir haben die einzelnen Posten, welche in die Berechnungen des Stoffwechsels eingehen, näher angegeben: Zufuhr, Abfall, Umsatz, Verbrennung, Bilanzen des Körpermateriales. Wir haben gesehen, wie jene Posten auf die drei Hauptgruppen der Körper- und Nahrungsstoffe verteilt werden und wie sie in energetischem Maße ausgedrückt werden können. Es erübrigt noch zu zeigen, wie man die Versuchsdaten in die Rechnung hineinbringt, und wie man aus diesen die wichtigsten der erwähnten Posten ableitet.

Bei den Stoffwechselversuchen — wir sehen von den Untersuchungen des intermediären Stoffwechsels ab — bestimmt man:

1. die Menge, die Zusammensetzung und die Verbrennungswärme der Kost, des Kotes und des Harnes — eventuell der Milch und anderer Sekrete;
2. die Kohlensäureabgabe, die Sauerstoffaufnahme und die Wasserausscheidung durch Lungen und Haut;
3. das Körpergewicht;
4. die Wärmeabgabe und die geleistete Arbeit.

Es ist aber nicht nötig, alle jene Bestimmungen auszuführen. Wir wollen hier eine Übersicht derjenigen Kombinationen liefern, welche gewöhnlich zur Anwendung kommen.

### 1. Untersuchung der Nahrung bei frei gewählter Kost.

Man geht von der Voraussetzung aus, daß ein Mensch bei frei gewählter Kost im allgemeinen die Nahrungszufuhr nach dem Bedarf einrichtet. Nimmt man eine hinreichend lange Beobachtungsperiode, dann sind die Veränderungen, welche die Organmasse, die Fett- und die Glykogenvorräte erleiden, geringfügig im Vergleich mit den Mengen der zugeführten Stoffe. Die mit der Nahrung aufgenommenen Mengen von Eiweiß, Fett und Kohlehydraten entsprechen also unter jenen Verhältnissen ganz genau dem Stoffumsatz im Körper.

Während einer Periode von mehreren Tagen bestimmt man also in der Kost die Zufuhr von Eiweiß, Fett und Kohlehydraten (Gramm pro Tage) nebst der Energiezufuhr (Kalorien pro Tage). Man kann hierbei in verschiedener Weise verfahren:

1. Man bestimmt die Menge der rohen Nahrungsmittel, welche eine Familie oder im allgemeinen eine Gruppe von Personen während einer bestimmten Zeit verbraucht. Der grobe Abfall wird abgezogen.

2. Man bestimmt die Menge der einzelnen tischfertigen Speisen, welche eine Person nach freier Wahl einnimmt.

3. Wie bei Versuchsanordnung 2 wird bei jeder Mahlzeit die genossene Kost gewogen, es werden aber außerdem aliquote Teile davon zur Analyse aufbewahrt.

Der Gehalt der einzelnen Nahrungsmittel bzw. Speisen an Nahrungsstoffen. Trockensubstanz und Asche wird entweder durch Analysen in jedem Falle bestimmt oder nach zugänglichen Durchschnittszahlen[1]) geschätzt.

Die Energiezufuhr wird entweder direkt kalorimetrisch bestimmt oder mittelst Durchschnittszahlen berechnet. Man benutzt bei dieser Berechnung meistens die *Rubner*schen Standardzahlen. Zu genaueren Berechnungen werden besondere Durchschnittszahlen für die betreffende Untersuchung abgeleitet (siehe oben, S. 1118).

Aus den in dieser Weise erhaltenen Bruttowerten berechnet man die Nettozufuhr entweder mittelst Ausnutzungskoeffizienten oder durch direkte Untersuchung des Kotes (siehe oben, S. 1121). Unter den oben angeführten Voraussetzungen gibt die Nettozufuhr den tatsächlichen Umsatz an. Wenn man den Stickstoff im Harne und im Kote bestimmt, hat man die Möglichkeit, das Stickstoffgleichgewicht und somit gewissermaßen auch das Zutreffen jener Voraussetzungen zu kontrollieren.

Als Beispiele für Untersuchungen dieser Art können wir die angeführten Arbeiten von *Hultgren* und *Landergren*, *Atwater* und seine Mitarbeiter, *Slosse* und *van de Weyer*, *Moquette*[2]), *Sundström* anführen.

## 2. Man bestimmt die Menge und die Zusammensetzung der Nahrung, den Harn- und Kotstickstoff und die Kohlensäureabgabe.

Die Versuchsdaten werden pro Tage berechnet:

| | Stickstoff<br>g | Fett<br>g | Kohlehydrate<br>g | $CO_2$<br>g |
|---|---|---|---|---|
| in der Kost . . . . | $(N)_{Kost}$ | (Fett) | (Kh.) | |
| im Kote . . . . . . | $(N)_{Kot}$ | | | |
| im Harne . . . . . . | $(N)_{Harn}$ | | | |
| $CO_2$-Abgabe . . . . . | | | | $(CO_2)$ |

Für die Berechnung des Stoff- und Energieumsatzes aus jenen Versuchsdaten nimmt man die folgenden Relationen als bekannt an:

[1]) In folgenden Arbeiten findet man eine große Anzahl von Nahrungsanalysen: *König*, Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. 2 Bände. 4. Aufl. Berlin 1904. — *Rubner*, Der Energiewert der Kost des Menschen. Zeitschr. f. Biol. Bd. 42. S. 261 (1901). — *Zuntz*, Höhenklima und Bergwanderungen (1906). — *Atwater* und *Bryant*, U. S. Dept. Agr., Office of Experiment Stations Bul. Nr. 28 (revised edition). 1902. — *Almén*, Våra vanligaste näringsmedels sammansättning. Stockholm 1885. — *Hultgren* und *Landergren*, Untersuchung über die Ernährung bei frei gewählter Kost. Hygiea. Festband 1889. — Dieselben, Die Ernährung schwedischer Arbeiter. Skrifter utgifna af Lorenska stiftelsen. Stockholm 1891. — Dieselben, Über die Ausnützung gemischter Kost im Darme des Menschen. Skand. Arch. Bd. 5. S. 132 (1898). — *Grönberg*, Våra vanligaste torlvämnen i kemiskt och dietetiskt afseende. Finska Läkaresällskapets handlingar. Bd. 45. S. 443 (1903). — *Ehrström*, Om sjukhuskost särskildt med hänsyn till förhållandena i Finland. Finska Läkaresällskapets handlingar. Bd. 47. S. 322 (1905).

[2]) *Moquette*, Onderzoekning over volksvoeding in de gemeente Utrecht. Utrecht 1907.

Gramm verbranntes Eiweiß pro Gramm Harnstickstoff . . . p

$\frac{C}{N}$ im verbrannten Eiweiß . . . . . . . . . . . . . . . q

$\frac{C}{N}$ im Harne . . . . . . . . . . . . . . . r

$CO_2$ *g* pro Gramm verbranntes Fett . . . . . . . . . . . s

$CO_2$ *g* pro Gramm verbrannte Kohlehydrate . . . . . . . t

Verbrennungswert des Eiweißes . . . . . . . . . . a Kal./*g*

" des Fettes . . . . . . . . . . b "

" der Kohlehydrate . . . . . . . . c "

Weiter nimmt man an, daß die zugeführten Kohlehydrate (Kh.) vollständig verbrannt werden und daß also die vom Körper abgegebene Kohlensäure ($CO_2$) nach der Herkunft in folgender Weise verteilt werden kann:

Kohlensäureabgabe . . . . . . . . . . . . . . . ($CO_2$) *g*/Tag

davon aus Eiweiß . . . . . . . . . . . . $\frac{11}{3}(q-r)\,(N)_{Harn}$ "

aus Kohlehydraten . . . . . . . . . . . . . t (Kh.) "

also aus Fett . . . . . . $(CO_2) - \frac{11}{3}(q-r)\,(N)_{Harn} - t\,(Kh.)$ "

Der Umsatz läßt sich dann in folgender Weise berechnen:

Eiweißverbrennung $= p\,(N)_{Harn}$ . . . . . . . . . *g*/Tag

Fettverbrennung $= \frac{1}{s}(CO_2) - \frac{11}{3}\cdot\frac{q-r}{s}(N)_{Harn} - \frac{t}{s}(Kh.)$ . . . . "

Kohlehydratverbrennung $= (Kh.)$ . . . . . . . . . . . . . "

Energieumsatz $= \frac{b}{s}(CO_2) - \left|\frac{11}{3}\cdot\frac{q-r}{s}\cdot b - ap\right|(N)_{Harn} - \left|\frac{t}{s}b - c\right|(Kh.)$ Kal/Tag

Stickstoffbilanz $= (N)_{Kost} - (N)_{Kot} - (N)_{Harn}$ *g*/Tag

Für die oben angeführten Konstanten können wir die folgenden numerischen Werte einsetzen:

| | | |
|---|---|---|
| p = 6·25 | s = 2·80 | a = 4·2 |
| q = 3·28 | t = 1·63 | b = 9·4 |
| r = 0·72 | | c = 4·2 |

und erhalten dann:

Eiweißverbrennung $= 6{\cdot}25\,(N)_{Harn}$ , . . . . . . . . . . *g*/Tag

Fettverbrennung $= 0{\cdot}36\,(CO_2) - 3{\cdot}35\,(N)_{Harn} - 0{\cdot}58\,(Kh.)$ "

Kohlehydratverbrennung $= (Kh.)$ . . . . . . . . . . . . . "

Energieumsatz $= 3{\cdot}36\,(CO_2) - 5{\cdot}3\,(N)_{Harn} - 1{\cdot}27\,(Kh.)$ . Kal./Tag

Wenn Alkohol in der Kost sich findet, nimmt man an, daß derselbe während des Versuches vollständig zersetzt wird und dabei 7·[illegible] Kalorien und 1·91 *g* Kohlensäure pro Gramm entwickelt.

Von den angenommenen Zahlen bietet r — das Verhältnis $\frac{C}{N}$ im Harne — die größten Schwankungen dar. Durch diese wird aber nur der Koeffizient des $(N)_{Harn}$ enthaltenden Ausdruckes beeinflußt. Da die Stickstoffausscheidung $(N)_{Harn}$ im Vergleich mit der Kohlensäureabgabe numerisch sehr klein ist — etwa 15 *g* N gegen mindestens 600 *g* $CO_2$ pro Tag —, sind diese Schwankungen ziemlich belanglos.

Die Berechnung der Kohlehydratverbrennung während des Versuches kann aber größere Fehler herbeiführen. Dieser Umsatz wird der Zufuhr gleichgesetzt. Enthält also die Kost gröbere Vegetabilien, so muß die Ausnutzung der Kohlehydrate im Darme in Betracht gezogen werden. Es muß weiter vorausgesetzt werden, daß der Glykogenvorrat des Körpers während des Versuches unverändert bleibt. Bei gewöhnlicher Kost ist man berechtigt, anzunehmen, daß die Schwankungen der Glykogenmenge im Körper von dem einen Tage zum anderen ziemlich geringfügig sind. Bei Übergang von gewöhnlicher zu kohlehydratarmer Kost oder umgekehrt kommen aber diejenigen Glykogenmengen, welche verbrannt bzw. abgelagert werden, in Betracht, und da man diese Mengen nicht ermitteln kann, wird die Berechnung unter solchen Verhältnissen etwas unsicher.

Die Zuverlässigkeit der Methode bei gewöhnlichen Nahrungsverhältnissen ist durch die oben erwähnten Versuche von *Rubner* und die ebenfalls schon angeführte Berechnung *Tigerstedts* dargelegt worden (siehe S. 1116).

**3. Man bestimmt den Sauerstoffverbrauch, die Kohlensäureabgabe und die Stickstoffausscheidung mit dem Harne.** Versuchsanordnung nach *Zuntz*.[1])

Die Versuchsdaten werden pro Minute berechnet:

| | |
|---|---|
| Sauerstoffverbrauch . . . . . . . . . . | $(O_2)$ *cm*³/Min. |
| Kohlensäureabgabe . . . . . . . . . . | $(CO_2)$ *cm*³/Min. |
| Harnstickstoff . . . . . . . . . . . | (N) *mg*/Min. |

Folgende Relationen werden als bekannt angenommen:

| | Bei Verbrennung von Eiweiß | Fett | Kohleh. |
|---|---|---|---|
| Kalorische Koeffizienten des Sauerstoffs[2]): Kal./*cm*³ $O_2$ | a | b | c |
| Respiratorische Quotienten: $CO_2/O_2$ . . . . . . . . | $q_1$ | $q_2$ | 1 |
| Sauerstoffverbrauch per *mg* Harnstickstoff: *cm*³ $O_2$/*mg* N | k | — | — |

Wir nehmen an, daß keine anderen Prozesse als Zerfall von Eiweiß, Fett und Kohlehydraten den Sauerstoffverbrauch und die Kohlensäureabgabe beeinflussen. Diese Größen ebenso wie den ganzen Energieumsatz können wir also auf jene Zerfallsprozesse folgendermaßen verteilen:

[1]) *Zuntz, Pflügers* Archiv. Bd. 68. S. 191.

[2]) Die Energiemengen werden in Gramm-Kalorien gerechnet.

| | | Eiweiß | | Fett | | Kohlehydrate | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $(O_2)$ | = | $x_1$ | + | $x_2$ | + | $x_3$ | . . . . . (1) |
| $(CO_2)$ | = | $q_1 x_1$ | + | $q_2 x_2$ | + | $x_3$ | . . . . . (2) |
| Energieumsatz | = | $a x_1$ | + | $b x_2$ | + | $c x_3$ | . . . . . (3) |

Die Größen $x_1$, $x_2$, $x_3$ lassen sich in den Versuchsdaten folgendermaßen ausdrücken:

$$x_1 = k\,(N)$$

$$x_2 = \frac{1}{1-q_2}\left\{(O_2) - (CO_2) - (1-q_1)\,k\,(N)\right\}$$

$$x_3 = \frac{1}{1-q_2}\left\{(CO_2) - q_2\,(O_2) - (q_1 - q_2)\,k\,(N)\right\}$$

Wenn wir diese Werte in die Gleichung (3) einsetzen, erhalten wir:

$$\text{Energieumsatz} := \frac{b-cq_2}{1-q_2}(O_2) + \frac{c-b}{1-q_2}(CO_2) + \left\{a - \frac{1-q_1}{1-q_2}b - \frac{q_1-q_2}{1-q_2}c\right\}k\,(N)$$

Wenn wir mit *Zuntz* folgende numerische Werte der betreffenden Konstanten annehmen[1]):

$k = 6{\cdot}064\ cm^3/mg\ N$,
$a = 4{\cdot}476$ Kal./$cm^3$ $O_2$, $\quad q_1 = 0{\cdot}793$,
$b = 4{\cdot}686$ Kal./$cm^3$ $O_2$, $\quad q_2 = 0{\cdot}707$,
$c = 5{\cdot}047$ Kal./$cm^3$ $O_2$,

erhalten wir:

Energieumsatz[1]) $= 3{\cdot}816\,(O_2) + 1{\cdot}232\,(CO_2) - 1{\cdot}92\,(N)$ . Kal./Min.
Eiweißverbrennung $= 6{\cdot}47\,(N)$ . . . . . . . . . . . $mg$/Min.
Fettverbrennung $= 1{\cdot}69\,\{(O_2) - (CO_2)\} - 2{\cdot}12\,(N)$ . . $mg$/Min.
Kohlehydratverbrennung $= 4{\cdot}12\,(CO_2) - 2{\cdot}91\,(O_2) - 2{\cdot}15\,(N)$ $mg$/Min.

Diese Methode, den Energieumsatz zu berechnen, ist im Prinzip von *Zuntz* angegeben. Sie ist die einzige, welche für kurze Beobachtungsperioden anwendbar ist. In der Berechnung gehen keine Daten, welche sich auf die Nahrungszufuhr beziehen, ein. Die Aufnahme von Sauerstoff und die Ausscheidung von Kohlensäure folgen sehr treu den Schwankungen der Zerfallsprozesse im Körper. Die Stickstoffausscheidung mit dem Harne steht zwar in dieser Hinsicht etwas zurück. Wie aus den oben mitgeteilten Formeln hervorgeht, wird aber das Endresultat von der Größe der Stickstoffausscheidung sehr wenig beeinflußt. Bei einem ruhenden Menschen kann die Größe des Sauerstoffverbrauches und diejenige der Kohlensäureabgabe bis auf 200 bzw. 160 $cm^3$ pro Minute hinabsinken, während die gleichzeitige Stickstoffausscheidung wohl selten bis 15 $mg$ pro Minute steigt. Es ist also hinreichend, in die obige Formel einen Durchschnittswert der

---

[1]) Die Energiemengen werden in Gramm-Kalorien gerechnet.

Stickstoffausscheidung einzuführen, welcher sich auf eine längere Beobachtungsperiode bezieht, als die Beobachtungen des Gaswechsels.

Die Grenzen, innerhalb welcher die betreffende Berechnungsmethode anwendbar ist, haben wir oben in Zusammenhang mit den Schwankungen des respiratorischen Quotienten erörtert.

**4. Man bestimmt den Stickstoff, den Kohlenstoff und die Verbrennungswärme der Kost, des Kotes und des Harnes, die Kohlensäureausscheidung und die Wärmeabgabe des Körpers (der geleisteten Arbeit einschließlich).** Versuchsanordnung nach *Atwater* und *Benedict.*[1])

Aus den Versuchsdaten lassen sich die Stickstoff- und Kohlenstoffbilanzen und der Nettobetrag der Energiezufuhr unmittelbar herleiten:

| | Stickstoff | Kohlenstoff | Energie | |
|---|---|---|---|---|
| | Gramm/Tag | Gramm/Tag | potentiell | aktuell |
| Kost . . . . | $(N)_1$ | $(C)_1$ | $(Kal.)_1$ | — |
| Kot . . . . | $(N)_2$ | $(C)_2$ | $(Kal.)_2$ | — |
| Harn . . . . | $(N)_3$ | $(C)_3$ | $(Kal.)_3$ | — |
| Kohlensäureabgabe | — | $(C)_4$ | — | — |
| Wärme und Arbeit | — | — | — | $(Kal.)_{beob.}$ |

$$(N)_1 - \{(N)_2 + (N)_3\} = (N)_{Bil.}$$
Stickstoffbilanz

$$(C)_1 - \{(C)_2 + (C)_3 + (C)_4\} = (C)_{Bil.}$$
Kohlenstoffbilanz

$$(Kal.)_1 - \{(Kal.)_2 + (Kal.)_3\} = (Kal.)_{netto}$$
Energiezufuhr netto

Für das abgelagerte resp. umgesetzte Körpereiweiß und Körperfett nimmt *Atwater* folgende Zusammensetzung und Verbrennungswerte an:

| | N | C | Kal. |
|---|---|---|---|
| 1 *g* Eiweiß . . . . . . . . . | 0·16 *g* | 0·53 *g* | 5·5 |
| 1 *g* Fett . . . . . . . . . . | — | 0·765 *g* | 9·4 |

Weiter wird angenommen, daß der Glykogenvorrat des Körpers während des Versuches unverändert bleibt. Die Kohlenstoffbilanz $(C)_{Bil.}$ verteilt sich also auf Eiweiß und Fett mit bez. $0{\cdot}53 \times 6{\cdot}25\ (N)$ und $(C)_{Bil.} - 3{\cdot}31\ (N)_{Bil.}$ Gramm.

Wir erhalten in dieser Weise:

Eiweißbilanz . . . . . . . . . . $(Eiw.)_{Bil.} = 6{\cdot}25\ (N)_{Bil.}$

Fettbilanz . . . . . . . . . . . $(Fett)_{Bil.} = 1{\cdot}31\ (C)_{Bil.} - 4{\cdot}34\ (N)_{Bil.}$

Bilanz der potentiellen Energie: . $(Kal.)_{Bil.} = 5{\cdot}5\,(Eiw.)_{Bil.} + 9{\cdot}4\,(Fett)_{Bil.} = 12{\cdot}31\ (C)_{Bil.} - 6{\cdot}41\ (N)_{Bil.}$

Energieumsatz, berechnet $= (Kal.)_{netto} - (Kal.)_{Bil.}$

" beobachtet $= (Kal.)_{beob.}$

[1]) *Atwater* und *Rosa*, A respiration calorimeter and experiments on the conservation of energy in the human body. *Storrs* Agricultural Experiment Station, 10th ann. Report. p. 212 (1897). — *Atwater* and *Benedict*, Bul. Nr. 136.

*Atwater* und *Benedict* haben nach dieser Methode eine sehr große Anzahl Versuche ausgeführt. Die sehr gute Übereinstimmung der beobachteten und der berechneten Werte des Energieumsatzes, welche sich bei diesen Versuchen erwiesen hat, beweist die Zuverlässigkeit der Methode.

### 5. Vollständiger Bilanzversuch.

Die oben (S. 1135) angeführten Größen werden sämtlich direkt bestimmt. Bis jetzt ist diese Versuchsanordnung nur bei den von *Benedict*[1]) mitgeteilten Untersuchungen zur Anwendung gekommen. Wir geben hier den Gang seiner Berechnung wieder.

*a)* Die Bilanz des Körpermateriales mit der Änderung des Körpergewichtes zusammengestellt:

| | Gramm | Gramm |
|---|---|---|
| **Einkommen:** | | |
| Kost . . . . . . . . . . | — | |
| Getränk . . . . . . . . . | — | |
| Sauerstoff . . . . . . . . | — | |
| **Ausgaben:** | | |
| Kot . . . . . . . . . . | — | |
| Harn . . . . . . . . . . | — | |
| Kohlensäure . . . . . . . | — | |
| Wasserdampf . . . . . . . | — | |
| Bilanz des Körpermateriales . . | | — |
| Änderung des Körpergewichtes . | | — |

*b)* Die Bilanz und der Umsatz des Körpermateriales, in bezug auf Grundstoffe und Körpersubstanzen berechnet. (Siehe die nebenstehende Tabelle.)

Sämtliche Einnahmen und Ausgaben des Körpers werden auf Grundstoffe verteilt; die Kost und der Kot außerdem auf die Gruppen Eiweiß, Fett etc. Der Kot (2) wird als Abfall betrachtet und direkt von der Kost (1) abgezogen. Man erhält in dieser Weise die Nettozufuhr (3). Die zugeführten Mengen (C)III, (H)III, (N)III, (O)III werden in Körpermaterial (4)

| | C | H | N | O | Eiw. | Fett | Kh. | Wasser | Asche | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Kost | (C)I | (H)I | (N)I | (O)I | (Eiw.)I | (Fett)I | (Kh.)I | (Wasser)I | (Asche)I | beob. | (1) |
| Kot | (C)II | (H)II | (N)II | (O)II | (Eiw.)II | (Fett)II | (Kh.)II | (Wasser)II | (Asche)II | beob. | (2) |
| Nettozufuhr | (C)III | (H)III | (N)III | (O)III | (Eiw.)III | (Fett)III | (Kh.)III | (Wasser)III | (Asche)III | diff. (1) − (2) | (3) |
| [illegible] Körpermaterial berechnet | | | | | (Eiw.)[illegible] | (Fett)[illegible] | (Kh.)[illegible] | (Wasser)[illegible] | | ber. | (4) |
| [illegible] | | | | (O)[illegible] | | | | | | beob. | (5) |
| [illegible] | [illegible] | [illegible] | [illegible] | (O)[illegible] | | | | (Wasser)[illegible] | (Asche)[illegible] | beob. | (6) |
| [illegible] Körpermaterial berechnet | | | | | (Eiw.)[illegible] | (Fett)[illegible] | (Kh.)[illegible] | (Wasser)[illegible] | (Asche)[illegible] | ber. | (7) |
| Bilanz | [illegible] | [illegible] | [illegible] | (O)[illegible] | (Eiw.)[illegible] | (Fett)[illegible] | (Kh.)[illegible] | (Wasser)[illegible] | (Asche)[illegible] | diff. (6) − (7) | (8) |

[1]) *Benedict*, The influence of inanition on metabolism. Washington 1907.

umgerechnet. Bei dieser Berechnung geht man von der angenommenen, durchschnittlichen Zusammensetzung der Körpersubstanzen aus:

(N) = 0·1667 (Eiw.).
(C) = 0·528 (Eiw.) + 0·761 (Fett) + 0·444 (Kh.).
(H) = 0·070 (Eiw.) + 0·118 (Fett) + 0·062 (Kh.) + 0·1119 (Wass.).
(O) = 0·220 (Eiw.) + 0·121 (Fett) + 0·494 (Kh.) + 0·8881 (Wass.).

Aus diesen Gleichungen erhält man:

(Eiw.) = 6·0 (N).
(Fett) = 0·005 (C) + 9·693 (H) — 1·221 (O) — 2·476 (N).
(Kh.) = 2·243 (C) — 16·613 (H) + 2·093 (O) — 2·892 (N).
(Wass.) = — 1·248 (C) + 7·920 (H) + 0·128 (O) + 0·460 (N).

In diesen Gleichungen setzt man die Werte $(C)_{III}$, $(H)_{III}$, $(N)_{III}$, $(O)_{III}$ ein und erhält die Werte $(Eiw.)_4$, $(Fett)_4$, $(Kh.)_4$, $(Wass.)_4$. Diese Werte weichen in der Regel sehr wenig von den Werten $(Eiw.)_3$, $(Fett)_3$, $(Kh.)_3$, $(Wass.)_3$ ab.

Die durch Lungen, Nieren und Haut ausgeschiedenen Mengen $(C)_{IV}$, $(H)_{IV}$, $(N)_{IV}$, $(O)_{IV}$ werden, nachdem man die Sauerstoffaufnahme $(O_2)$ abgezogen hat, in eben angegebener Weise in Körpermaterial umgerechnet (7). Die hierbei erhaltenen Größen $(Eiw.)_{zerf.}$, $(Fett)_{zerf.}$, $(Kh.)_{zerf.}$ stellen das im Körper zersetzte Material dar.

Die Größe $(Wass.)_{pref.}$ — das präformierte Wasser — gibt denjenigen Teil der totalen Wasserausscheidung $(Wass.)_{tot.}$ an, welcher aus der zugeführten Wassermenge bzw. dem Wasservorrat des Körpers stammt. Die Differenz $(Wass.)_{tot.}$ — $(Wass.)_{pref.}$ stellt diejenige Wassermenge dar, welche bei der Verbrennung im Körper während des Versuches entstanden ist. Die Differenz $(Wass.)_4$ — $(Wass.)_{pref.}$ stellt die Wasserbilanz $(Wass.)_{Bil.}$ des Körpers dar.

Die Bilanzen der Körpersubstanzen (8) erhält man entweder als Differenzen zwischen Zufuhr (4) und Umsatz (7) oder durch Umrechnung der Werte $(C)_{Bil.}$, $(H)_{Bil.}$, $(N)_{Bil.}$, $(O)_{Bil.}$ in Körpermaterial. Die beiden Berechnungen sollen identische Resultate geben.

*c)* Der Energieumsatz ergibt sich teils direkt aus der Wärmeabgabe und der geleisteten Arbeit während des Versuches — (Kal.) —, teils indirekt aus dem berechneten Zerfall der Körpersubstanzen.

| | | |
|---|---|---|
| Verbrennungswert des zersetzten Eiweißes . . | 5·65 $(Eiw.)_{zerf.}$ . . . . . . . . | ber. |
| Verbrennungswärme des Harnes . . . . . . | $(Kal.)_{Harn}$ . . . . . . . | beob. |
| Kalorien aus Eiweiß . . . . . . . . . . . | 5·65 $(Eiw.)_{zerf.}$ — $(Kal.)_{Harn}$ | diff. |
| „ „ Fett . . . . . . . . . . . . . | 9·54 $(Fett)_{zerf.}$ . . . . . . . . | ber. |
| „ „ Kohlehydraten . . . . . . . | 4·19 $(Kh.)_{zerf.}$ . . . . . . . . | ber. |
| Energieumsatz berechnet . . . . . . . . . | $(Kal.)_{ber.}$ . . . . . . . . | ber. |
| Wärme und Arbeit . . . . . . . . . . | (Kal.) . . . . . . . . | beob. |

*d)* Die Bilanz der potentiellen Energie des Körpers wird ebenfalls in zwei verschiedenen Weisen abgeleitet:

| | | |
|---|---|---|
| Zufuhr potentieller Energie . . . . . . . . . . | $(\text{Kal.})_{\text{Kost}}$ | . . . beob. |
| Verlust an potentieller Energie . . . . . . . . | $(\text{Kal.})_{\text{Kot}} + (\text{Kal.})_{\text{Harn}}$ | . . . beob. |
| Nettozufuhr potentieller Energie . . . . . . . | $(\text{Kal.})_{\text{netto}}$ | . . . diff. |
| Wärme und Arbeit . . . . . . . . . . . . . . . | (Kal.) | . . . beob. |
| Bilanz der potentiellen Energie . . . . . . . . | $(\text{Kal.})_{\text{netto}} - (\text{Kal.})$ | . . . diff. |
| „ „ „ „ | $5{\cdot}65\,(\text{Eiw.})_{\text{Bil.}} + 9{\cdot}54\,(\text{Fett})_{\text{Bil.}} + 4{\cdot}19\,(\text{Kh.})_{\text{Bil.}}$ | ber. |

Die Übereinstimmung der in verschiedener Weise abgeleiteten Werte des Energieumsatzes gibt die Zuverlässigkeit der Berechnung an. Diese Methode ist die einzige, mit welcher man die Wasserbildung und die Änderungen des Glykogenvorrates im Körper ermitteln kann.

## IV. Respirationsapparate.

Die Bestimmungen des Gaswechsels und der Wärmeabgabe des Körpers erfordern besondere Anordnungen: Respirationsapparate und Kalorimeter.

Man kann drei Typen von Respirationsapparaten unterscheiden, welche sämtlich bis auf die Arbeiten von *Lavoisier* zurückgeführt werden können. Die drei Typen werden nach denjenigen Autoren genannt, welche dieselben für Versuche in größerem Maßstabe ausgebildet haben.

Typus 1. Prinzip von *Regnault* und *Reiset*. Das Versuchsindividuum befindet sich in einer geschlossenen Respirationskammer. Kohlensäure und Wasserdampf werden absorbiert, je nachdem sie abgegeben werden und der verbrauchte Sauerstoff wird aus einem besonderen Behälter ersetzt. Die Respirationskammer nebst den Absorptionsgefäßen und den Luftleitungen stellen einen geschlossenen Kreis dar. Man bestimmt direkt die während einer Versuchsperiode zugeführte Sauerstoffmenge bzw. die absorbierten Mengen von Kohlensäure und Wasserdampf, nebst denjenigen Änderungen, welche die in dem geschlossenen System enthaltenen Gasmengen während der Versuchsperiode erlitten haben.

Typus 2. Prinzip von *Pettenkofer* und *Voit*. Durch die Respirationskammer wird ein Luftstrom von außen gesaugt. Die Kammer ist also in einer offenen Ventilationsleitung eingeschaltet. Diese Leitung enthält entweder Absorptionsgefäße, in welchen die Kohlensäure und der Wasserdampf des Luftstromes aufgenommen werden, oder Vorrichtungen zur Entnahme von Luftproben und zur Messung der Ventilationsgröße. Man bestimmt oder berechnet die Mengen von Kohlensäure und Wasserdampf, welche mit dem Ventilationsstrom aus der Respirationskammer fortgeleitet bzw. derselben zugeführt worden sind, eventuell auch die Änderungen der Zusammensetzung, welche die Luft in der Respirationskammer während einer Versuchsperiode erlitten hat.

Typus 3. Verfahren von *Zuntz*. Das Versuchsindividuum atmet durch Mundstück, Rohre, welche in die Nasenlöcher eingeführt werden, Maske oder Trachealkanüle. Die In- und Exspirationsluft werden durch Ventile geschieden. Die Kohlensäureabgabe und der Sauerstoffverbrauch ergeben

sich als Differenzen zwischen den ein- und ausgeatmeten Mengen der betreffenden Gase.

### Typus 1.

Die nach dem Prinzipe von *Regnault* und *Reiset* konstruierten Apparate erlauben eine Bestimmung sämtlicher Komponenten des Gaswechsels. Nach diesem Prinzipe ist es möglich gewesen, die Rolle des atmosphärischen Stickstoffs beim Stoffwechsel im tierischen Organismus direkt zu untersuchen, und man kann sagen, daß die technische Vollendung der hierher gehörenden Respirationsapparate mit der Behandlung jener in prinzipieller Hinsicht so wichtigen Frage in Zusammenhang steht. Wir

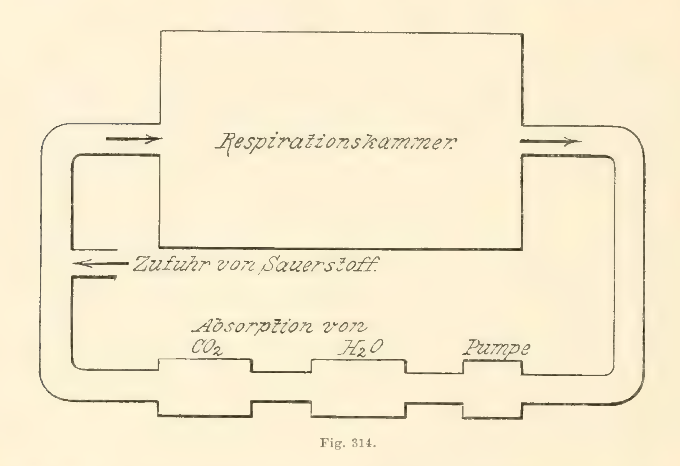



Fig. 314.

erwähnen die älteren Apparate von *Regnault* und *Reiset*[1]), *Seegen* und *Nowak*[2]) und die modernen von *Krogh*[3]) und von *Oppenheimer*[4]).

Die angeführten Apparate sind verhältnismäßig klein. Apparate, welche sich für Respirationsversuche an Menschen eignen, sind nach diesem

[1]) *Regnault* et *Reiset*, Recherches chimiques sur la respiration des animaux des diverses classes. Ann. de chim. et de phys. [3.] T. **27**. p. 299 (1849). Übers. in den Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. **73**. S. 92 (1850).

[2]) *Seegen* und *Nowak*, Versuche über die Ausscheidung von gasförmigem Stickstoff aus den im Körper umgesetzten Eiweißstoffen. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **19**. S. 347 (1879).

[3]) *Krogh*, Experimentelle Untersuchungen über die Ausatmung freien Stickstoffs aus dem Körper. Sitzungsber. d. Wiener Akad. Bd. **115**. Abt. 3 (1906); engl. in Skand. Arch. f. Physiol. Bd. **18**. S. 364 (1906).

[4]) *Oppenheimer*, Über die Frage der Anteilnahme elementaren Stickstoffs am Stoffwechsel der Tiere. Bioch. Zeitschr. Bd. **4**. S. 328 (1907).

Typus von *Hoppe-Seyler*[1]) und von *Atwater* und *Benedict*[2]) konstruiert worden.

Die Arbeiten von *Krogh* und von *Atwater* und *Benedict* enthalten in reichlicher Menge wertvolle Angaben betreffs konstruktiver Details.

In Fig. 314 wird die Versuchsanordnung in schematischer Weise dargestellt. Ein Apparat nach diesem Typus besteht aus Respirationskammer, Anordnungen für die Absorption von Kohlensäure und Wasserdampf und für die Zufuhr von Sauerstoff, Pumpwerk, das die Luft durch die Absorptionsgefäße treibt und schließlich Vorrichtungen zur Entnahme von Luftproben. In solchen Fällen, in denen brennbare Gase von dem

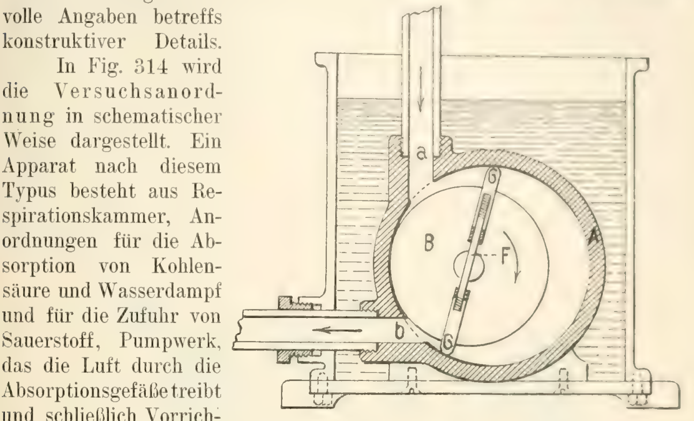



Fig. 315.
Rotationspumpe von *Atwater* und *Benedict*.
Die Luft tritt bei *a* ein und wird bei *b* ausgetrieben. Die [illegible] *G* werden von Spiralfedern gegen die innere Oberfläche des Zylinders *A* während der Umdrehung der Trommel *B* gedrückt.

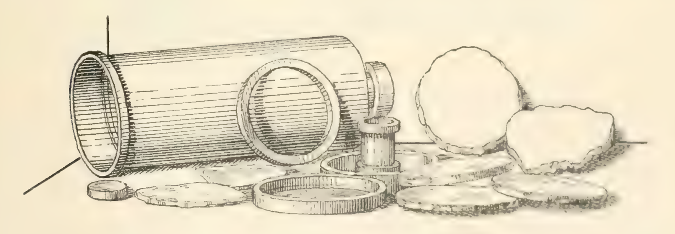


Fig. 316.
Absorptionszylinder nebst Scheiben von Natronkalk. (*Atwater* und *Benedict*.)

Versuchstier abgegeben werden, schaltet man in die Leitung ein Verbrennungsrohr ein.

[1]) *Hoppe-Seyler*, Apparat zur Messung der respiratorischen Aufnahme und Abgabe von Gasen am Menschen nach dem Prinzipe von *Regnault*. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **19**. S. 574 (1894).

[2]) *Atwater* and *Benedict*, A respiration calorimeter with appliances for the direct determination of oxygen. Washington (1905).

Die Berechnung des Sauerstoffverbrauches und der Abgabe von Kohlensäure und Wasser, eventuell auch der Abgabe oder Aufnahme von Stickstoff, wird nach der Formel $p + \beta_2 V_2 - \beta_1 V_1$ ausgeführt. p bezeichnet die während der Versuchsperiode zugeführte bzw. die absorbierte Menge des betreffenden Gases, $\beta_1$ und $\beta_2$ den Gehalt desselben und $V_1$ und $V_2$ das Volumen des Gasraumes — Kammer und Leitungen — am Anfang und Ende der Versuchsperiode.

Da es mit gewissen Schwierigkeiten verbunden sein kann, das Volumen des Gasraumes bzw. die Temperatur und den Druck in demselben genau zu bestimmen, ordnet man im allgemeinen die Versuche in der Weise an, daß die Größe $\beta_2 V_2 - \beta_1 V_1$ möglichst klein im Vergleich mit der Größe p ausfällt, d. h. die Respirationskammer wird möglichst klein genommen, so daß die in demselben enthaltene Luftmenge während einer Versuchsperiode mehrmals durch die Absorptionsgefäße getrieben wird. Weiter sucht man

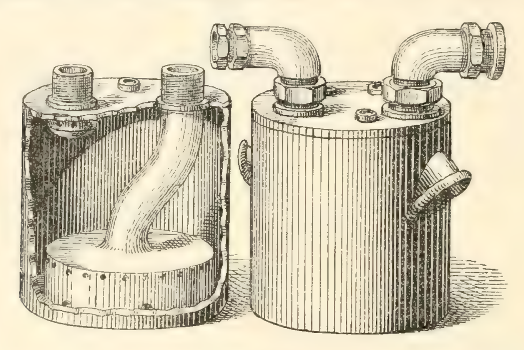


Fig. 317.
Absorptionsgefäß, enthaltend konzentrierte Schwefelsäure. (*Atwater* und *Benedict*.)

Temperatur, Feuchtigkeit und Druck in der Kammer während der Versuchsperiode möglichst konstant zu halten, oder jedenfalls die Schwankungen derselben möglichst genau zu bestimmen. Bei kleineren Apparaten wird die Kammer nebst den Leitungen und dem Pumpwerke in ein Wasserbad versenkt (siehe Fig. 318 und 319). Bei größeren Apparaten sorgt man am besten durch elektrische Ventilatoren für eine gleichmäßige Temperatur in der Kammer.

Das Treiben der Luft durch die Absorptionsgefäße verursacht Druckschwankungen. Bei den Ablesungen läßt man daher das Pumpwerk stillstehen. Die Apparate von *Krogh* und von *Atwater* und *Benedict* sind mit besonderen Vorrichtungen versehen, um Druckdifferenzen zwischen Kammer- und Außenluft auszugleichen.[1]) Die entsprechenden Volumschwankungen werden in solchem Falle berücksichtigt.

---

[1]) Siehe Fig. 318: Kompensationsbehälter.

**Pumpwerk.** Bei den älteren Apparaten wurden zwei durch Schlauche miteinander verbundene Absorptionsgefäße durch eine Schaukelvorrichtung abwechselnd erhöht und gesenkt. Die hierbei entstehende Bewegung der Luft in den Leitungen wurde mittelst Ventilen in einen gleichgerichteten Strom verwandelt. *Oppenheimer* bedient sich einer einfachen Pumpe mit den Absorptionsgefäßen als Ventile angeordnet (siehe Fig. 319). *Atwater* und *Benedict* wenden eine Rotationspumpe mit Exzentervorrichtung an, welche zur Sicherung gegen Leckage in Öl versenkt wird (siehe Fig. 315). *Krogh* läßt den Pumpenkolben von Magneten treiben, welche der Außenseite des Zylinders entlang gleiten (siehe Fig. 318).

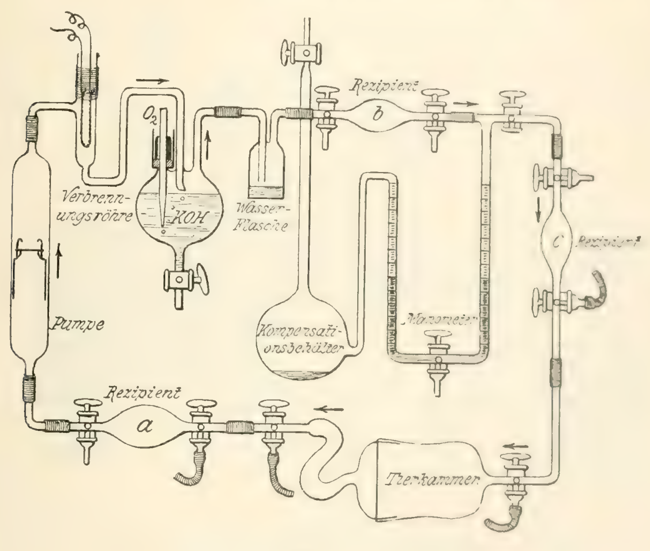



Fig. 318.
Respirationsapparat von *Krogh*.

**Absorption von Kohlensäure.** Meistens läßt man die Kohlensäure von Ätzalkali oder Ätznatron aufnehmen. Von der Flüssigkeit werden vor und nach dem Versuche aliquote Teile in einen Überschuß von Schwefelsäure hinübergeleitet, die in dem Rezipienten einer Quecksilberpumpe enthalten ist. Nach Auspumpen wird die Kohlensäure durch Analyse in einem *Petterson*schen Apparate bestimmt. *Haldane* hat zur Aufnahme der Kohlensäure die Anwendung von Natronkalk eingeführt und *Atwater* und *Benedict* haben zu diesem Zwecke besondere Absorptionszylinder konstruiert (siehe Fig. 316). Die Luft wird in getrocknetem Zustande in die Zylinder eingetrieben und geht unmittelbar nachher durch ein Ge-

fäß mit konzentrierter Schwefelsäure, welche das dem feuchten Natronkalk entnommene Wasser wieder aufnimmt. Die Gewichtszunahme der beiden Gefäße während einer Versuchsperiode gibt die betreffende Kohlensäureentwicklung an.

Absorption von Wasser. Meistens läßt man die Bestimmung der Wasserabgabe beiseite. Nur bei dem Apparat von *Atwater* und *Benedict* finden sich besondere zu diesem Zwecke konstruierte Vorrichtungen (siehe Fig. 317). Der Wasserdampf wird von konzentrierter Schwefelsäure aufgenommen und die Menge desselben durch die Gewichtszunahme des betreffenden Absorptionsgefäßes angegeben.

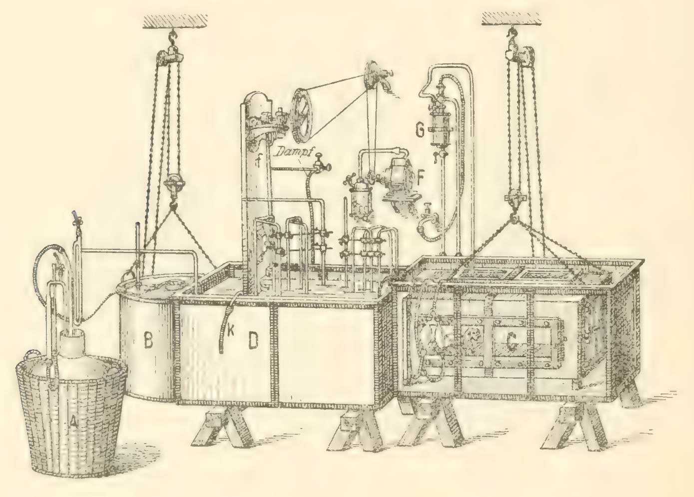



Fig. 319.

Respirationsapparat von *Oppenheimer*.

*A* Sauerstoffflasche; *B* Druckgefäß; *C* Respirationskammer, in Wasser versenkt; *D* Wanne mit Pumpe *f* und Kaliventilen; *F* Motor; *G* Wasserstrahlpumpe zum Durchblasen von Luft; *k* Zweigleitung zur Probeentnahme von Sauerstoff.

Zufuhr von Sauerstoff. *Krogh* hat einen Vorgang beschrieben, um möglichst reinen Sauerstoff in die Leitung zur Respirationskammer einzulassen und zugleich den Druck im ganzen System — Respirationskammer, Leitungen und Absorptionsgefäße — zu regulieren. Bei Versuchen, bei denen größere Mengen Sauerstoff verbraucht werden, bedient man sich des sogenannten reinen Sauerstoffs des Handels. Derselbe kann nicht direkt aus der Bombe in die Leitung zur Respirationskammer eingelassen werden. Erstens muß der Druck etwa bis Atmosphärendruck herabgebracht werden, zweitens muß das Gas von beigemengter Kohlensäure befreit werden, und wenn man die Wasserabgabe des Versuchsindividuums bestimmen will, auch ge-

trocknet werden. Der käufliche Sauerstoff enthält wechselnde Mengen von Stickstoff und man muß daher den Inhalt der betreffenden Bombe analysieren. Die in die Respirationskammer eingeführte Sauerstoffmenge wird entweder aus der Gewichtsabnahme der Sauerstoffbombe berechnet (*Atwater* und *Benedict*) oder mittelst einer Gasuhr gemessen (*Hoppe-Seyler*) oder in der Weise ermittelt, daß man das Gewicht des Wassers bestimmt, welches aus einem Niveaugefäß in den Sauerstoffbehälter einströmt, je nachdem das Gas in die Respirationskammer eingelassen wird (*Oppenheimer*, siehe Fig. 319).

## Typus 2.

Unter den nach dem Prinzipe von *Pettenkofer* und *Voit* konstruierten Respirationsapparaten sind außer dem ursprünglichen *Pettenkofer*schen[1]), die Apparate der folgenden Autoren zu erwähnen: *Liebermeister*[2]), *Haldane*[3]), *Sondén* und *Tigerstedt*[4]), *Atwater* und *Rosa*[5]) und *Jaquet*[6]).

Bei den meisten von jenen Apparaten läßt sich nur die Kohlensäureproduktion des Versuchsindividuums mit hinreichender Genauigkeit bestimmen. Die Bestimmung der Wasserabgabe wird immer dadurch erschwert, daß die Wände der Respirationskammer und die verschiedenen Geräte in derselben die Feuchtigkeit der Luft in oft unberechenbarer Menge absorbieren. Man sucht diese Fehlerquelle zu beseitigen, indem man die Temperatur und die Dampfspannung der Luft in der Kammer während der Versuchsperiode möglichst konstant hält. Was den Sauerstoffverbrauch betrifft, hat nur *Jaquet* denselben direkt bestimmt. Bei den übrigen Methoden, welche sich auf das Prinzip von *Pettenkofer* und *Voit* gründen, wird der Sauerstoffverbrauch als Differenz zwischen einerseits dem Anfangsgewicht und der Einnahme des Versuchsindividuums, andrerseits dem Endgewicht und den Ausgaben bestimmt. Sämtliche Versuchsfehler häufen sich bei diesem Verfahren auf die Bestimmung des Sauerstoffverbrauches. Besonders können die ungenauen Bestimmungen der Wasserabgabe große Fehler herbeiführen. Die unten beschriebene Methode von *Haldane* bietet

---

1) *Pettenkofer*, Über die Respiration. Ann. d. Chem. u. Pharm. Suppl.-Bd. **2**. S. 1 (1862).

2) *Liebermeister*, Untersuchungen über die quantitativen Veränderungen der Kohlensäureproduktion beim Menschen. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. **7**. S. 75 (1870).

3) *Haldane*, A new form of apparatus for measuring the respiratory exchange of animals. Journ. of Physiol. Vol. **13**. p. 419 (1892).

4) *Sondén* und *Tigerstedt*, Untersuchungen über die Respiration und den Gesamtstoffwechsel des Menschen. Skand. Arch. f. Physiol. Bd. **6**. S. 1 (1895).

5) *Atwater* and *Rosa*, A respiration calorimeter and experiments on the conservation of energy in the human body. Tenth annual report of the *Storrs* agricultural experiment station. p. 212 (1897).

6) *Jaquet*, Ein neuer Apparat zur Untersuchung des respiratorischen Stoffwechsels des Menschen. Verhandl. d. naturforsch. Ges. in Basel. Bd. **15**. S. 252 (1903).

in dieser Hinsicht einen Vorteil dar, indem das **Versuchstier zusammen mit der Kammer gewogen wird.**

Die Bestimmungen der betreffenden Gasmengen werden in zwei verschiedenen Weisen ausgeführt. Entweder leitet man den Ventilationsstrom, wie bei den Apparaten nach dem Prinzip von *Regnault* und *Reiset*, durch Absorptionsgefäße, deren Gewichtszunahme bestimmt wird, oder man mißt die Ventilationsgröße und entnimmt Luftproben, deren Zusammensetzung mittelst gasanalytischer Methoden festgestellt wird.

Als Beispiel des Absorptionsverfahrens wollen wir die Methode von *Haldane* beschreiben. In Fig. 320 wird die Versuchsanordnung wiedergegeben.

Die Absorptionsgefäße *1* und *4* enthalten Natronkalk, *2*, *3* und *5* mit Schwefelsäure durchgetränkte Bimssteinstücke. In *1* und *2* wird die Luft vor dem Eintritt in die Respirationskammer *(Ch)* von Kohlensäure

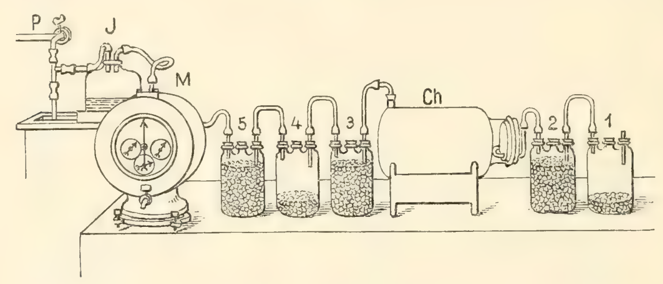



Fig. 320.
**Respirationsapparat von *Haldane*.**

und Feuchtigkeit vollständig befreit. In den Flaschen *3* und *4* wird die aus der Kammer stammende Feuchtigkeit bzw. Kohlensäure absorbiert. Die Flasche *5* nimmt das aus dem feuchten Natronkalk in der Flasche *4* stammende Wasser auf. Die Kammer mit dem Tiere und die Flaschen *3*, *4*, *5* werden am Anfang und am Ende der Versuchsperiode gewogen, und zwar die Flaschen *4* und *5* zusammen.

Mit Anwendung folgender Bezeichnungen:

| | Kammer | Flasche *3* | Flasche *4* u. *5* |
|---|---|---|---|
| Anfangsgewicht . . . | $r_1$ | $q_1$ | $p_1$ |
| Endgewicht . . . . | $r_2$ | $q_2$ | $p_2$ |

können wir die Kohlensäureproduktion ($CO_2$), die Wasserabgabe ($H_2O$) und den Sauerstoffverbrauch ($O_2$) folgendermaßen berechnen:

$$(CO_2) = p_2 - p_1$$
$$(H_2O) = q_2 - q_1$$
$$(O_2) = (p_2 + q_2 + r_2) - (p_1 + p_1 + r_1).$$

Für die Berechnung braucht man nicht die Ventilationsgröße zu messen. Die Gasuhr *M* ist in die Leitung eingeschaltet, um die Geschwindigkeit des Luftstromes zu kontrollieren und somit die vollständige Absorption der Kohlensäure und der Feuchtigkeit zu sichern.

Es wird bei der Berechnung vorausgesetzt, daß die Veränderungen der Luft in der Respirationskammer während der betreffenden Versuchsperiode belanglos sind.[1] Besonders muß beachtet werden, daß die Ergebnisse der Wägungen der Kammer, und somit auch die Genauigkeit bei der Bestimmung des Sauerstoffverbrauches, von der Temperatur der Luft in der Kammer abhängen.

Bei Apparaten für größere Versuchstiere wird nicht der ganze Ventilationsstrom durch die Absorptionsgefäße geleitet, sondern nur ein aliquoter Teil desselben.

Die Versuchsanordnung bei Anwendung gasanalytischer Methoden wird in Fig. 321 schematisch angegeben.

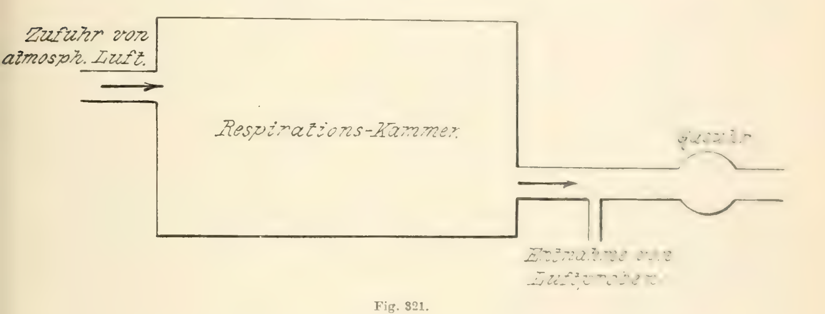



Fig. 321.

Für die Zufuhr wird atmosphärische Luft angewendet, deren Zusammensetzung als bekannt angenommen werden kann. Die Gasuhr gibt das Volumen der in einer Versuchsperiode ausventilierten Luft an. Von dem Ventilationsstrome kann man, wie *Jaquet*, *Atwater* und *Rosa*, einen aliquoten Teil abzweigen, welcher für die Analyse verwendet wird. Bei den Apparaten von *Liebermeister* und von *Tigerstedt* und *Sondén* werden Proben am Anfang und am Ende jeder Versuchsperiode entnommen.

Zur Analyse der entnommenen Luftproben eignen sich am besten die von *O. Petterson* und *Klas Sondén* konstruierten Apparate.[2]

Wenn man die durchschnittliche Zusammensetzung der ausventilierten Luft bestimmt *(Jaquet)*, wird die Berechnung folgendermaßen ausgeführt:

[1]) Siehe unten.

[2]) Über die Methoden der Gasanalyse vergl. S. 554 ff.

Setzen wir

$V$ = Volumen ($m^3$) der ausventilierten Luft auf 0° und 760 *mm* reduziert.
$\beta$ = Kohlensäuregehalt (pro Mille) der ausventilierten Luft,
$\beta_0$ = „ „ „ „ atmosphärischen Luft,
$\gamma$ = Sauerstoffgehalt „ „ „ ausventilierten Luft,
$\gamma_0$ = „ „ „ „ atmosphärischen Luft,

$$\varepsilon = \frac{1000-(\beta+\gamma)}{1000-(\beta_0+\gamma_0)},$$

so erhalten wir für die betreffende Versuchsperiode

die Kohlensäureproduktion $= (\beta - \varepsilon\beta_0)\, V$ . . . Liter
den Sauerstoffverbrauch $= (\varepsilon\gamma_0 - \gamma)\, V$ . . . „

Es wird bei dieser Berechnung[1]) vorausgesetzt, daß die Zusammensetzung der Luft in der Respirationskammer während der betreffenden Versuchsperiode keine Veränderung erleidet oder jedenfalls, daß die Schwankungen derselben belanglos sind. Um dies zu erreichen, nimmt man das Volumen der Respirationskammer möglichst klein und ordnet die Versuche so an, daß die Kohlensäureproduktion des Versuchsindividuums während der Versuchsperiode sich möglichst unverändert hält. Bei kurzdauernden Versuchen wird also entweder vollständige Ruhe eingehalten oder eine bestimmte Arbeit pro Zeiteinheit verrichtet. Unter solchen Verhältnissen tritt bald ein stationärer Zustand in der Respirationskammer ein, und wenn möglich, wartet man diesen Zeitpunkt für den Anfang der eigentlichen Versuchsperiode ab. Bei Versuchsperioden längerer Dauer treten die in der Respirationskammer enthaltenen Gasmengen neben den ausventilierten in den Hintergrund und die Schwankungen der ersteren können ganz vernachlässigt werden.

Der Apparat von *Sondén* und *Tigerstedt* zeichnet sich im Vergleich mit den oben besprochenen dadurch aus, daß die Respirationskammer verhältnismäßig groß ist. Man erreicht dadurch gewisse Vorteile. Die Versuchsperson kann sich sehr bequem machen, was bei langdauernden Versuchen von Bedeutung ist. Man kann leicht Ergostaten, Leitern zum Klettern, verschiedene Arbeitsmaschinen usw. anbringen, und man kann mehrere Versuchspersonen auf einmal untersuchen. Der Kohlensäuregehalt der Luft erreicht keine höheren Werte und die Verhältnisse in der Kammer weichen von denjenigen im gewöhnlichen Leben sehr wenig ab. Andrerseits aber stellt diese Methode große Anforderungen an die Empfindlichkeit der angewendeten gasanalytischen Methoden. Sogar die sehr empfindliche *Pettersonsche* Methode reicht zur Bestimmung des Sauerstoffs nicht aus. Zurzeit kann also nur die Kohlensäureproduktion mit diesem Apparate bestimmt werden.

In bezug auf die Versuchsanordnung wird das Verfahren von *Sondén* und *Tigerstedt* wie dasjenige von *Liebermeister* dadurch gekennzeichnet,

[1]) Wie bei der oben erwähnten *Haldane*schen Methode.

daß man nicht Durchschnittsproben während einer Versuchsperiode entnimmt, sondern die Zusammensetzung der Luft in der Respirationskammer in gewissen **Momenten** bestimmt. Die Luft in der Kammer muß also gut gemischt werden und die Probeentnahme sehr schnell vor sich gehen.

Die Temperatur der Kammer wird durch Distanzthermometer, welche an verschiedenen Plätzen angebracht sind, ermittelt. Die Feuchtigkeit bestimmt man mittelst Psychrometer. In der Kammer befindet sich ein von außen regulierbarer Kalorifer, durch welchen man sowohl kaltes wie warmes Wasser leiten kann.

Die Luftproben werden direkt aus der Kammer entnommen. Gleichzeitig liest man die Thermometer, den Psychrometer, den Barometer und den Stand der Gasuhr ab.

Bei der **Berechnung** wenden wir die folgenden Bezeichnungen an:

$V$ = Volumen ($m^3$) der während der Versuchsperiode aus der Kammer ausströmenden Luft,
$A$ = Volumen ($m^3$) der Luft in der Kammer (Luftkubus),
$t$ = Temperatur in der Kammer, Mittel für die Versuchsperiode,
$p$ = Dampfdruck ($mm$ Hg) „ „ „ „ „ „ „
$B$ = Barometerstand,
$\beta_0$ = Kohlensäuregehalt (pro Mille) der einströmenden (atmosphärischen) Luft,
$\beta_1$ = „ in der Kammer am Anfang der Versuchsperiode,
$\beta_2$ = „ „ „ „ „ Ende „ „

Wenn es sich nur um die Berechnung der Kohlensäureabgabe handelt, kann man das Volumen der einströmenden Luft gleich $V$ setzen. Das Volumen $V$ wird aus den Angaben der Gasuhr unter Berücksichtigung der Temperatur- und Feuchtigkeitsdifferenzen der Kammer und der Gasuhr berechnet. Durch Regulieren der Ventilation bezüglich der Dauer der Versuchsperiode kann man das Verhältnis $\frac{V}{A}$ in der Weise abpassen, daß der **Kohlensäuregehalt während der Versuchsperiode fast linear wächst.** Unter diesen Verhältnissen läßt sich die Kohlensäureabgabe ($CO_2$) in folgender Weise berechnen[1]:

$$(CO_2) = 1{\cdot}966 \cdot \frac{1}{1 + \alpha t} \cdot \frac{B - p}{760} \cdot \left[ A(\beta_2 - \beta_1) + V \frac{\beta_1 + \beta_2}{2} - V \beta_0 \right] \ldots \text{Gramm}$$

Es ist zu bemerken, daß die mittelst des Analysenapparates erhaltenen Werte des Kohlensäuregehaltes sich auf trockene Luft beziehen. In der angeführten Formel bezeichnet $p$ das Mittel von dem Dampfdruck $p_1$ und $p_2$ am Anfang und am Ende der Versuchsperiode. Wenn die Differenz $p_2 - p_1$ mehrere Millimeter beträgt, z. B. bei intensiver Muskelarbeit, muß

[1] Die Zuverlässigkeit dieser Berechnungsweise ist mehrmals geprüft, siehe *Tora Rosenberg*, Prüfung des *Sondén-Tigerstedt*schen Respirationsapparates. Skand. Arch. f. Physiol. Bd. 16. S. 79 (1904).

man die einzelnen Werte $\beta_1$ und $\beta_2$, welche sich auf trockene Luft beim Drucke $B-p_1$ bzw. $B-p_2$ beziehen, auf feuchte Luft beim Drucke B umrechnen. Diese Korrektur läßt sich nach der Formel:

$$\beta \text{ korr} = \beta \text{ obs} \left(1 - \frac{p \text{ obs}}{B}\right)$$

ausführen.

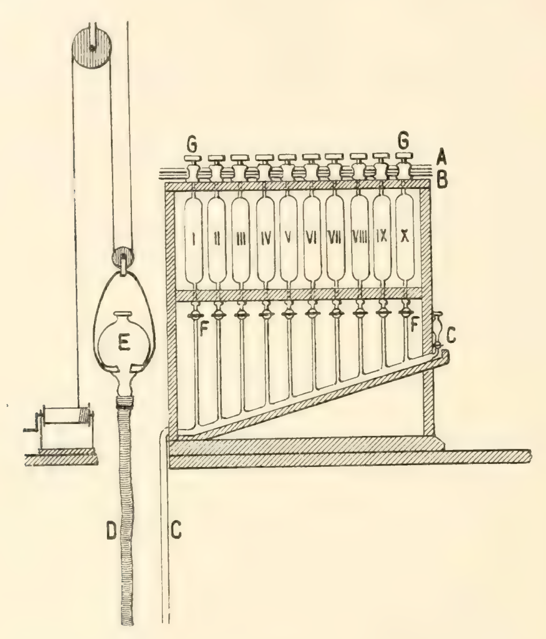



Fig. 322.

Apparat zur Entnahme von Luftproben *(Johansson)*.

Durch den Schlauch *D* und das Rohrsystem *C C* können die Pipetten *I—X* mit Quecksilber aus der Füllkugel *E* gefüllt werden bzw. vollständig luftleer gemacht werden. Die schiefe Stellung des Hahnes *C* ermöglicht die Pipette *II* zu evakuieren, ohne Luftblasen unterhalb des Hahnes *F* in der schon evakuierten Pipette *I* zu erhalten usw. Durch das Rohr *A* wird mittelst einer Wasserstrahlpumpe ein Luftstrom aus der Respirationskammer gesaugt. Das Kapillarrohr *B* führt zum Analysenapparat. Wird eine luftleere Pipette durch Drehung des Hahnes *G* mit dem Hahn *A* in Verbindung gesetzt, so füllt sich die Pipette in wenigen Sekunden mit Luft aus der Respirationskammer.

Pumpwerk. Bei den Apparaten nach dem Prinzip von *Pettenkofer* und *Voit* wird die Luft durch das System — Respirationskammer und Absorptionsgefäße — gesaugt. Man bedient sich entweder Saugzylindern, Wasserstrahlpumpen, Rotationspumpen, oder man läßt die Achse der Gasuhr, welche die Ventilationsluft mißt, von einem Motor getrieben werden. Durch eine besondere Leitung wird atmosphärische Luft zugeführt. Diese Leitung muß in der Weise angeordnet sein, daß bei plötzlichen

Windstößen auf diesem Wege keine Luft aus der Kammer ausgesaugt werden kann.

Es werden dieselben Absorptionsvorrichtungen angewendet wie bei den Apparaten nach Typus 1. Bei dem Apparat von *Atwater* und *Rosa* wird sowohl die einströmende wie die aus der Kammer ausgesaugte Luft bis etwa — 20° C abgekühlt. Das kondensierte Wasser wird gewogen.

Probeentnahme. Zur Entnahme von Durchschnittsproben bedient man sich meistens eines von *Zuntz* eingeführten Verfahrens, welches weiter unten (S. 1156) beschrieben wird. *Atwater* und *Rosa* haben eine von *Blakeslee* konstruierte „Meßpumpe" angewendet.

Eine Vorrichtung zur Entnahme von Luftproben in bestimmten Zeitmomenten hat *Johansson*[1]) beschrieben. Sie ist in Fig. 322 dargestellt.

## Typus 3.

Die hierher gehörigen Methoden zeichnen sich dadurch aus, daß man ausschließlich den respiratorischen Gaswechsel bestimmt. Die Respirationswege des Versuchsindividuums werden direkt mit der Ventilationsleitung verbunden. Man untersucht also die Exspirationsluft direkt, ohne dieselbe sich mit der Außenluft mischen zu lassen. Es brauchen daher nicht so große Anforderungen an die Empfindlichkeit der angewendeten gasanalytischen Methoden gestellt zu werden, und infolgedessen kann auch die Sauerstoffaufnahme bequem bestimmt werden. Da keine Respirationskammer nötig ist, wird der ganze Apparat transportabel. Die Versuchsanordnung macht es auch möglich, das Atemvolum bzw. die Größe der Atemzüge zu bestimmen. Andrerseits kommt die Komplikation hinzu, daß das Versuchsindividuum statt frei durch Maske, Mundstück oder andere Vorrichtungen atmen muß.

Das Verfahren hat im Laboratorium von *Zuntz* einen hohen Grad von Vollendung erhalten. Fig. 323 gibt die Versuchsanordnung wieder.[2]) Der Apparat besteht aus Mundstück mit Ventilen, Gasuhr mit einer Vorrichtung zur Entnahme von Luftproben und einem Gasanalysenapparat. Das Mundstück besteht aus einer Hartgummiplatte, welche zwischen die Lippen bzw. Backen und die Kiefer geschoben wird. Die Nase wird mittelst einer Klemme oder durch Einführen von Baumwollebäuschen verschlossen.

Die In- und Exspirationsluft werden durch Ventile voneinander geschieden. *Zuntz* benutzt zu diesem Zwecke sog. Darmventile. Die Ventilklappe besteht aus einem Stück Rinderdarm, welches um das Ende eines Glasrohres befestigt wird. Das Darmstück hat vorher in Glyzerin gelegen. Das Glasrohr mit dem Darmstück wird in ein weiteres Rohr hineingeführt

[1]) *Johansson*, Über den Einfluß der Temperatur in der Umgebung auf die Kohlensäureabgabe des menschlichen Körpers. Skand. Arch. f. Physiol. Bd. 7. S. 148 (1896).

[2]) *Geppert*, Die Einwirkung des Alkohols auf den Gaswechsel des Menschen. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. 22. S. 367 (1887).

und, wie Fig. 323 zeigt, mittelst eines Gummistöpsels am Ende desselben befestigt.

Die Exspirationsluft wird mittelst einer Gasuhr gemessen. Aus der Leitung nach der Gasuhr wird während der Versuchsperiode eine Durchschnittsprobe in eine Pipette hineingesaugt. Die Pipette, welche sich in der Wanne *W* (Fig. 323) befindet, ist am Anfang der Versuchsperiode mit Quecksilber gefüllt. Je nachdem das Quecksilber durch den Schlauch *D* abfließt, füllt sich die Pipette durch das obere Ende mit Luft aus der Exspirationsleitung. Das Abfließen des Quecksilbers wird in folgender Weise geregelt. Die Achse der Gasuhr trägt ein Rad, um welches die in der Fig. 323 sichtbare Schnur gewickelt ist. Die kapillare Mündung *A* des

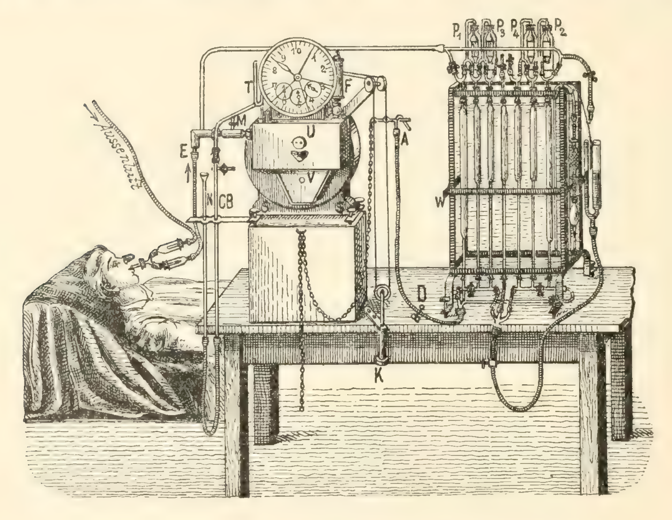



Fig. 323.
Der *Zuntz-Geppert*sche Apparat zur Untersuchung des Lungen-Gaswechsels.

Schlauches ist an dieser Schnur befestigt und wird während der Umdrehung der Gasuhr allmählich gesenkt. Die zum Analysenapparat [1]) gehörenden Büretten befinden sich in der Wanne *W*.

In modifizierter Form kann der ganze Apparat von der Versuchsperson beim Marschieren getragen werden (siehe Fig. 324). Die Exspirationsluft wird in solchem Falle durch eine trockene Gasuhr gemessen. [2])

Das von der Gasuhr angegebene Volumen der Exspirationsluft wird auf 0° und 760 *mm* reduziert. Zu diesem Zwecke hat *Zuntz* ein Instru-

---

[1]) Die gasanalytischen Methoden werden in einer anderen Abteilung behandelt.

[2]) *Zuntz* u. a., Das Höhenklima. Berlin 1906.

ment, Thermobarometer, konstruiert. In einem Glasgefäß, das mit einem Kapillarrohr verbunden ist, wird mittelst eines Wassertropfens eine Luftmenge abgesperrt. Das Kapillarrohr trägt eine Graduierung, deren Teilstrich 100 dem Volumen der abgesperrten Luft bei 0° und 760 *mm* entspricht. Die abgesperrte Luftmenge soll bei der Anwendung des Instrumentes dieselbe Temperatur, Feuchtigkeit und Druck annehmen wie die zu messende Luftmenge.

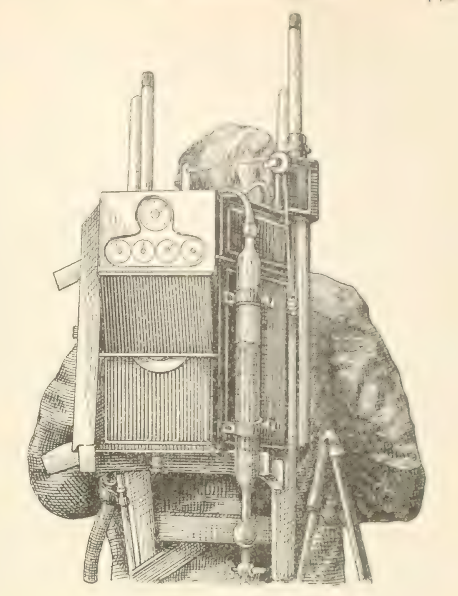


Fig. 324.
Trockene Gasuhr mit Gassammelrohr.

Die Berechnung wird folgendermaßen ausgeführt:

V = Volumen ($cm^3$) der während einer Versuchsperiode ausgeatmeter Luft, auf 0° und 760 *mm* reduziert,
$\beta$ = Kohlensäuregehalt (%) der Exspirationsluft,
$\beta_0$ = „ (%) der Inspirationsluft (atmosphärische Luft),
$\gamma$ = Sauerstoffgehalt (%) der Exspirationsluft,
$\gamma_0$ = „ (%) der Inspirationsluft (atmosphärische Luft).

$$\varepsilon = \frac{100 - (\beta + \gamma)}{110 - (\beta_0 + \gamma_0)},$$

$$\text{Kohlensäureabgabe} = \frac{\beta - \varepsilon \beta_0}{100} V \ldots\ldots cm^3,$$

$$\text{Sauerstoffverbrauch} = \frac{\varepsilon \gamma_0 - \gamma}{100} V \ldots\ldots cm^3.$$

*Tissot*[1]) hat einen Apparat beschrieben, bei welchem die Exspirationsluft in einen genau equilibrierten Spirometer während der Versuchsperiode aufgesammelt und gemessen wird.

Zu diesem Typus ist auch ein von *Benedict*[2]) angegebener Apparat zu rechnen. Die Versuchsperson atmet direkt in die Ventilationsleitung,

[1]) *Tissot*, Nouvelle méthode de mesure et d'interruption du débit et des mouvements respiratoires. Journ. de physiologie et de pathologie générale. p. 692 (1904).

[2]) *Benedict*, An apparatus for studying the respiratory exchange. Amer. Journ. of Physiology. Vol. 24. p. 345 (1909).

welche in derselben Weise wie bei dem oben erwähnten Typus 1 angeordnet ist. Die Leitung enthält aber keine Ventile zur Trennung der In- und Exspirationsluft.

## V. Kalorimeter.

Die Kalorimeter, welche zur direkten Bestimmung der Wärmeproduktion bei Menschen oder Tieren dienen, zeichnen sich dadurch aus, daß das Innere, der eigentliche Kalorimeterraum, ventiliert wird. Die betreffenden Apparate können gleichzeitig als Respirationsapparate eingerichtet sein und werden in solchem Falle Respirationskalorimeter genannt.

Es werden ganz andere Forderungen an diese Apparate gestellt als an die Kalorimeter für rein physikalische Zwecke. Die einzelnen Versuche dauern Stunden oder Tage. Um eine Versuchsperson oder ein größeres Versuchstier aufnehmen zu können, müssen die Apparate sehr groß sein. Die zu bestimmenden Wärmemengen werden daher auf verhältnismäßig große Massen verteilt. Während einer Versuchsperiode darf die Temperatur in der nächsten Umgebung des Versuchsindividuums keine größeren Schwankungen erleiden. Dagegen ist es wünschenswert, Versuche bei verschiedener Temperatur anstellen zu können.

Die physiologische Kalorimetrie zielt zunächst darauf ab, die Intensität — Kalorien pro Zeiteinheit — einer Wärmequelle zu bestimmen. Es leuchtet hieraus ein, daß solche Methoden, bei welchen die zu messende Wärmemenge innerhalb des Kalorimeters angehäuft wird, sich für die physiologischen Untersuchungen wenig eignen.[1] Man ist daher immer mehr zu Methoden übergegangen, bei welchen die von dem betreffenden Versuchsindividuum abgegebene Wärmemenge sukzessive aus dem Kalorimeter entfernt wird. Wir können diese Methoden in drei Gruppen teilen.

Gruppe 1. Absorptionskalorimeter oder Kalorimeter für konstante Temperatur. Der Kalorimeter, welcher von dem umgebenden Medium möglichst vollständig isoliert ist, enthält besondere Vorrichtungen zur Absorption derjenigen Wärme, die das Versuchsindividuum abgibt. Die Temperatur im Kalorimeterraum wird hierdurch konstant erhalten.

Gruppe 2. Strahlungskalorimeter. Die von dem Versuchsindividuum abgegebene Wärmemenge wird durch die Wände des Kalorimeters auf das umgebende Medium übertragen, dessen Temperatur möglichst konstant erhalten wird.

Gruppe 3. Anemokalorimeter. Die Wärmequelle im Kalorimeterraum bewirkt einen Luftstrom, welcher zur Bestimmung der abgegebenen Wärmemenge benutzt wird.

1. **Absorptionskalorimeter oder Kalorimeter für konstante Temperatur.** Am einfachsten läßt man die Wärmemenge, welche die zu untersuchende Wärmequelle abgibt, von dem Ventilationsstrom aus dem Kalorimeterraum aufgenommen werden (Ventilationskalorimeter). Man

[1] Eine Reihe von Apparaten, nach dem Prinzip des gewöhnlichen Wasserkalorimeters konstruiert, wird von *Haldane, White* und *Washburn* erwähnt. Journ. of Physiol. Vol. **16**. p. 124 (1894).

hat nur die Temperatur und Feuchtigkeit der ein- und ausströmenden Luft samt der Ventilationsgröße zu bestimmen und kann daraus die betreffende Wärmemenge berechnen. Apparate nach diesem Prinzip sind von *d'Arsonval*[1]) und von *Lefèvre*[2]) beschrieben. Die spezifische Wärme der Luft ist aber sehr gering und man muß daher verhältnismäßig große Luftmengen durch den Kalorimeterraum treiben, was störend ist, besonders wenn man gleichzeitig den Gaswechsel untersuchen will.

Da der Ventilationsstrom nicht hinreichend ist, um die vom Versuchsindividuum abgegebene Wärmemenge aufzunehmen, muß man besondere Absorptionsvorrichtungen anwenden. Man läßt die betreffende Wärmemenge von schmelzendem Eis, von einer verdampfenden Flüssigkeit oder von einem Wasserstrom aufnehmen.

Die Wärmeabsorption findet entweder in einem Mantelraum rings um den Kalorimeterraum statt, oder es wird eine Absorptionsvorrichtung in dem Kalorimeterraum selbst angebracht. Das erstere ist der Fall bei den Eiskalorimetern von *Lavoisier* und *Laplace* und von *Bunsen*, bei den Verdampfungskalorimetern von *Rosenthal*[3]) und von *d'Arsonval*[4]) und bei den selbstregulierenden Wasserkalorimetern von *d'Arsonval*[4]) und von *Lefèvre*[5]). Eine Wärmeabsorption im Innern des Kalorimeterraumes findet statt bei dem Respirationskalorimeter von *Atwater*, *Rosa* und *Benedict*[6]) und bei dem Apparat von *Marcet*[7]).

Die **Eiskalorimeter** eignen sich wenig für Tierversuche, weil das Tier bei der niedrigen Temperatur im Kalorimeterraum unter abnorme Verhältnisse kommt.

In Fig. 325 teilen wir das Schema eines **Verdampfungskalorimeters** mit. Bis jetzt haben aber diese Apparate nur geringe Anwendung in der physiologischen Kalorimetrie gefunden.

Bei den meisten Absorptionskalorimetern für physiologische Zwecke wird die im Kalorimeterraum abgegebene Wärmemenge von einem Wasserstrom aufgenommen. Wenn man diesen Strom, in ähnlicher Weise wie den Gaszufluß bei den Thermoregulatoren, nach der Wärmeentwicklung im Kalorimeterraum abstuft, erhält man einen selbstregulierenden Apparat.

***d'Arsonvals* selbstregulierender Kalorimeter für konstante Temperatur** besteht aus zwei konzentrischen Metallzylindern (Fig. 326). Der innere begrenzt den eigentlichen Kalorimeterraum. Der

---

[1]) *d'Arsonval*, Soc. Biol. 29 mai 1886.

[2]) *Lefèvre*, La calorimétrie par ventilation. Journ. de Physiol. et de Path. T. 3. p. 523 (1901).

[3]) *Rosenthal*, Arch. f. Anat. u. Physiol. S. 349 (1878).

[4]) *d'Arsonval*, Recherches de calorimétrie. Journ. de l'anat. et de la physiol. T. 22. p. 113 (1886).

[5]) *Lefèvre*, Calorimétrie par double courant de compensation. Journ. de physiol. et de pathol. T. 4. p. 257, 411 (1902).

[6]) *Atwater* and *Rosa*, a. a. O. — *Atwater*, Neue Versuche über Stoff- und Kraftwechsel im menschlichen Körper. Ergebn. d. Physiol. Jahrg. 3. Abt. 1. S. 495 (1904). — *Atwater* and *Benedict*, A respiration calorimeter. 1905.

[7]) *Marcet*, A calorimeter for human body. Proc. Roy. Soc. Vol. 63. p. 232 (1898).

Mantelraum zwischen den beiden Zylindern ist mit einer Flüssigkeit gefüllt und enthält ein Spiralrohr, durch welches ein automatisch regulierbarer

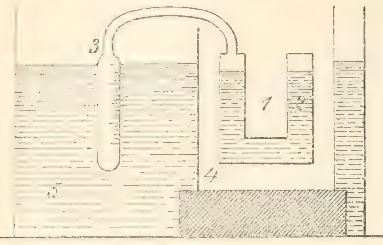



Fig. 325.
Scheme des Verdampfungskalorimeters nach *d'Arsonval*. *1.* Kalorimeterraum. *2.* Mantelraum, der eine Flüssigkeit mit niedrigem Siedepunkt enthält. Der Mantelraum steht mit dem graduierten Behälter *3* in Verbindung. *4.* Luftraum. *5.* Wasserbad. Der Mantelraum *2* nebst dem Behälter *3* darf nur die betreffende Flüssigkeit und den entsprechenden Dampf, aber keine Luft enthalten. Wenn eine Wärmequelle in den Kalorimeter eingebracht wird, destilliert eine gewisse Menge der Flüssigkeit aus dem Mantelraume in den Behälter *3* hinüber. Aus der verdampften Flüssigkeitsmenge kann die abgegebene Wärmemenge berechnet werden.

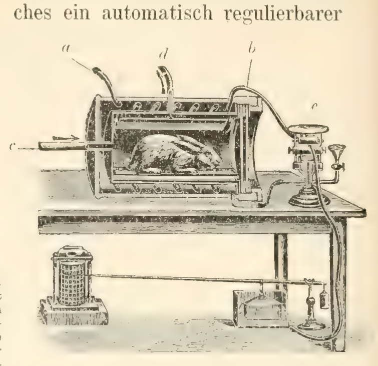



Fig. 326.
*d'Arsonvals* selbstregulierender Kalorimeter für konstante Temperatur.

Wasserstrom während der ganzen Versuchsdauer fließt. Das Zuflußende *(a)* jenes Rohres steht mit einem Gefäß, enthaltend Wasser bei 0°, in Verbindung. In dem Abflußrohr *(b)* ist ein Stromregulator eingeschaltet. Durch den Kalorimeterraum, in welchem das Versuchstier sich befindet, wird ein Luftstrom gesaugt. Ein Drahtnetz verhindert das Tier, mit den Wänden des Kalorimeters in Berührung zu kommen. Die vom Versuchstier abgegebene Wärmemenge wird von der Flüssigkeit im Mantelraume aufgenommen. Die Flüssigkeit dehnt sich aus und wirkt hierbei auf eine im Stromregulator befindliche Membran. Entsprechend der Hebung dieser Membran wird ein Ventil geöffnet, welches den Strom des Kühlwassers in der Weise reguliert, daß aus dem Kalorimeter eine gleich große Wärmemenge fortgeführt wird, wie die vom Versuchstier in derselben Zeit abgegebene.

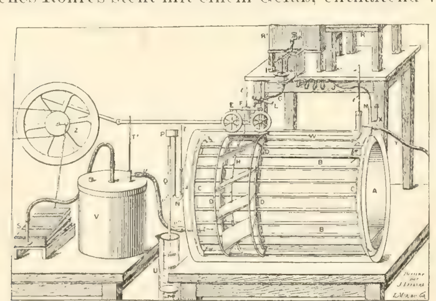


Fig. 327.
Selbstregulierender Wasserkalorimeter von *Lefèvre*. *A* Eingang zum Kalorimeterraum. Das Rohrsystem *B* und *C* im Mantelraume steht durch die Leitung *M*, *J* mit dem Stromregulator *I* in Verbindung. Aus dem Behälter *R* strömt das Kühlwasser durch den Stromregulator *I* und das Rohr *G* in einen kleinen Behälter *F*, wo die Temperatur des Wassers bestimmt wird, ehe dasselbe durch das Abflußrohr *H* in den Mantelraum eingegossen wird. Der kleine Wagen *E*, welcher von dem Rad *Z* getrieben wird, erteilt dem Rührer *D* und dem Abflußrohr *H* eine hin- und hergehende Bewegung in dem Mantelraum, wodurch die Temperatur in diesem Raume möglichst gleichförmig bleibt. Die Temperatur des Kühlwassers wird sowohl vor dem Eintritt in den Mantelraum wie beim Abfluß durch das Rohr *N* gemessen. Das ausströmende Kühlwasser wird im Meßzylinder *U* aufgesammelt. Die Ventilationsluft wird mittelst des Blasebalges *S* aus dem Behälter *V* in den Kalorimeterraum getrieben.

Zur Berechnung dieser Wärmemenge bestimmt man die Temperatur und die Menge des abfließenden Wassers. Fig. 326 zeigt, wie diese Wassermenge auf einem rotierenden Zylinder aufgeschrieben werden kann.

Der selbstregulierende Wasserkalorimeter von *Lefèvre* (Fig. 327) stellt eine Entwicklung des *d'Arsonval*schen Apparates dar. Das Kühlwasser strömt nicht durch ein spiralförmiges Rohr, sondern kommt direkt in den Mantelraum selbst hinein, dessen Inhalt mittelst einer besonderen Vorrichtung gemischt wird. In dem Mantelraum befindet sich ein geschlossenes Rohrsystem, Alkohol enthaltend, welches mit dem Stromregu-

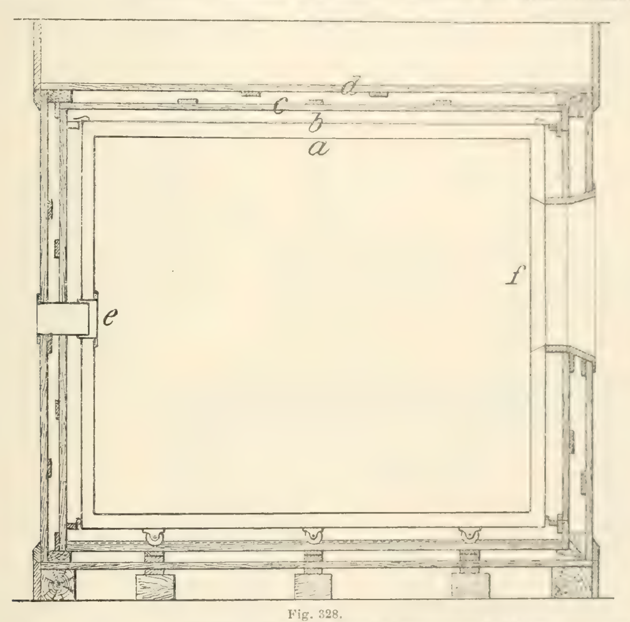



Fig. 328.

Respirationskalorimeter von *Atwater* und *Benedict*. Vertikaler Durchschnitt des Kalorimeterraumes. *a* Kupferwand, *b* Zinkwand, *c* und *d* Holzwände, *e* Öffnung zur Einführung von Speisen, [illegible] Die Tür ist nicht ersichtlich.

lator in Verbindung steht. Die Temperatur im Kalorimeterraum wird auch durch den Ventilationsstrom geregelt.

Bei den folgenden Apparaten ist die Vorrichtung zur Wärmeabsorption im Innern des Kalorimeterraumes angebracht. Die Regulierung derselben findet nicht automatisch statt, sondern wird von dem Beobachter ausgeführt.

Respirationskalorimeter von *Atwater*, *Rosa* und *Benedict*. Der Kalorimeterraum (Fig. 328) stellt ein kleines Wohnzimmer dar, mit doppelten Metallwänden *a*, *b* und doppelten Holzwänden *c*, *d*. Die zwischen diesen Wänden befindlichen Lufträume geben eine gute Wärmeisolierung.

Die innere Metallwand *a* besteht aus poliertem Kupferblech, das die strahlende Wärme gut reflektiert, die äußere Metallwand besteht aus Zinkblech. In den Metallwänden rings um den ganzen Kalorimeterraum ist ein System von thermoelektrischen Elementen, dessen Anordnung aus Fig. 329 ersichtlich wird, eingepaßt. Im Luftraum zwischen der Zinkwand *b* und der inneren Holzwand *c* befindet sich teils ein System von Neusilberdrähten zur elektrischen Heizung, teils ein System von eisernen Röhren, durch welche Kühlwasser geleitet werden kann. Die Thermoelemente werden mit einem *d'Arsonval*-Galvanometer verbunden, mittelst welchem man die kleinsten Temperaturunterschiede zwischen der Kupfer- und der Zinkwand entdecken kann. Die einzelnen Seitenwände bzw. Dach und Boden können in dieser Beziehung gesondert geprüft werden. Mittelst der angegebenen Erwärmungs- bzw. Kühlvorrichtungen können jeweilige Temperaturdifferenzen sofort beseitigt werden. Jeder Wärmetransport durch die Wände aus dem Kalorimeterraum oder in denselben hinein wird in dieser Weise verhindert.

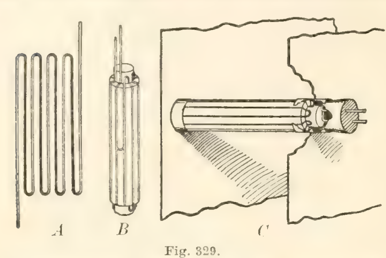



Fig. 329.
*A* Thermoelemente, bestehend aus Eisen (schwarz) und Neusilber. *B* Die Elemente auf einem Holzstab montiert. *C* Die Elemente in den Metallwänden eingepaßt.

Die von der Versuchsperson im Kalorimeterraum erzeugte Wärmemenge wird von Wasser, das in einem Wärmeabsorptionsrohr aus Kupfer strömt, aufgenommen und aus dem Kalorimeterinnern fortgeführt. Zur Vergrößerung der Absorptionsfläche trägt das Rohr Scheiben aus Kupferblech. Die Anordnung dieses Absorptionssystems wird in Fig. 330 dargestellt. Ein Beobachter reguliert die Tempe-

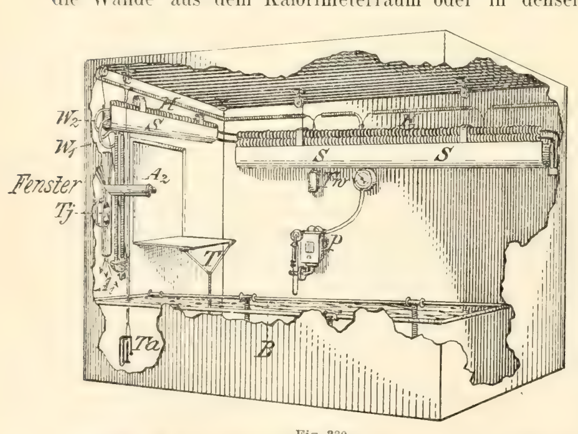



Fig. 330.
Das Innere des Kalorimeterraumes. $A_1$, $A_2$ zuführende und abführende Luftleitung. *H* Kupferrohr mit Scheiben zur Wärmeabsorption. $W_1$, $W_2$ zuführende und abführende Wasserleitung für das Wärmeabsorptionssystem. *S* stellbare Schirme, welche das Wärmeabsorptionsrohr mehr oder weniger frei halten. *Ta*, *Tw* elektrische Thermometer, welche die Luft- bzw. Wandtemperatur angeben. *Tj* elektrischer Thermometer, welcher die Temperaturdifferenz der ein- und ausströmenden Luft angibt. *T* Tisch, *B* Bett, *P* Telephon.

ratur des einströmenden Wassers und die Stromgeschwindigkeit desselben. so daß die Temperatur im Kalorimeterraum unverändert bleibt, d. h. daß die absorbierte Wärmemenge der jeweiligen Wärmeproduktion entspricht. Zur feineren Regulation der Wärmeaufnahme ist das Wärmeabsorptionsrohr von verstellbaren Schirmen *S* umgeben.

Die Temperatur der einströmenden Luft wird auch durch besondere Vorrichtungen (Fig. 331) geregelt, und zwar so, daß sie derjenigen im Kalorimeterraum gleich ist. Vor dem Einströmen in den Kalorimeter wird die Luft vollständig getrocknet. Man hat also bei den Berechnungen nur die in der ausströmenden Luft enthaltene Dampfmenge zu berücksichtigen.

Die in einer Versuchsperiode im Kalorimeterinnern erzeugte Wärmemenge ergibt sich aus dem Gewicht und der Temperaturdifferenz des ein- und ausströmenden Wassers. Dazu kommt diejenige Wärmemenge, welche mit dem Wasserdampf der ausventilierten Luft fortgeführt wird. Auch die etwaigen Temperaturänderungen, welche die Luft im Kalorimeterraum oder die Metallwände oder schließlich die Versuchsperson selbst während der betreffenden Versuchsperiode erlitten haben, werden berücksichtigt.

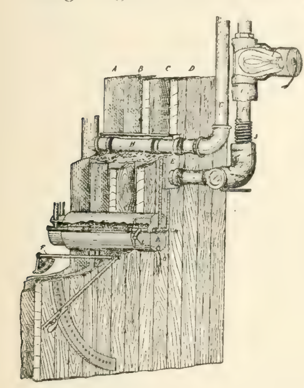



Fig 331.
*A* Kupferwand, *B* Zinkwand, *C* und *D* Holzwände, *F* zuführende Luftleitung mit Vorrichtungen zur Erwärmung (*I*) und Abkühlung (*J*) der Luft. *G* Abführende Luftleitung. In der Kalorimeterwand sind die beiden Leitungen in einem Isolierkästchen *E* eingeschlossen. *K* Holzstab mit Bohrungen für die zu- und abführenden Wasserleitungen zum Wärmeabsorptionssystem und für die elektrischen Leitungen (*O*). Die beiden Thermometer, welche die Temperaturen des ein- und ausströmenden Wassers angeben, sind auch ersichtlich (*M*). *P* Vorrichtung zum Heben und Senken der Schirme um das Wärmeabsorptionsrohr.

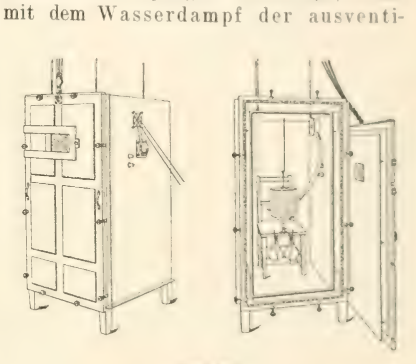


Fig. 332.
Kalorimeter von *Marcet*.

Der Kalorimeter von *Marcet* (Fig. 332) ist im wesentlichen nach demselben Prinzip wie der Apparat von *Atwater* konstruiert. Der Kalorimeterraum ist von poliertem Kupferblech begrenzt, das die strahlende Wärme reflektiert. Die Kupferwand ist von einem wärmeisolierenden Luftraum umschlossen, der nach außen von einer Holzwand begrenzt wird. Die von dem Versuchsindividuum abgegebene Wärmemenge wird innerhalb des Kalorimeterraumes von schmelzendem Eis aufgenommen. Ein von außen regulierbarer elektrischer Ventilator treibt die Luft des Kalorimeterraumes durch ein Gefäß, das zerbrochenes Eis enthält. Ein anderer Ventilator

sorgt für eine gute Mischung der Luft im Kalorimeterraum. Mittelst besonderer Thermometer werden die Temperaturen des Schmelzwassers, der Luft im Kalorimeterraum, der Kupferwand und des isolierenden Luftraumes bestimmt. Die drei letzteren Temperaturbestimmungen werden von dem Beobachter außerhalb des Kalorimeters ausgeführt. Der Luftstrom durch den Eisbehälter wird von dem Beobachter in der Weise reguliert, daß die Temperaturen im Kalorimeterraum und in der Kupferwand sich unverändert halten.

Die zu bestimmende Wärmemenge ergibt sich aus der Menge und der Temperatur des Schmelzwassers. Übrigens sind dieselben Korrekturen wie bei dem *Atwater*schen Apparat auszuführen. Eine Komplikation wird dadurch bedingt, daß die elektrischen Ventilatoren eine gewisse Wassermenge im Kalorimeterraum entwickeln, die sich nicht immer berechnen läßt.

2. **Strahlungskalorimeter** wurden ursprünglich von *Scharling*[1]) und von *Hirn*[2]) angewendet. Später hat *d'Arsonval*[3]) nach diesem Prinzip mehrere Apparate konstruiert, von welchen wir hier einen Strahlungskalorimeter für Versuche an Menschen, einen Differentialkalorimeter und einen thermoelektrischen Strahlungskalorimeter erwähnen. Zu dieser Gruppe gehören weiter die Luftkalorimeter von *Rubner*[4]) und von *Rosenthal*[5]), der Kompensationskalorimeter von *Haldane*[6]) und der thermoelektrische Kalorimeter von *Henriques*[7]).

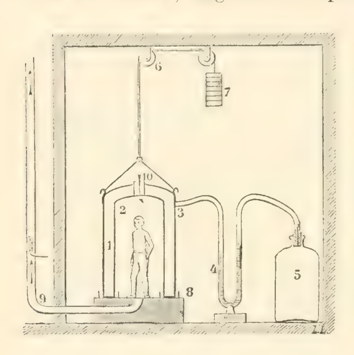



Fig. 333.
Luftkalorimeter nach *d'Arsonval*. *1.* Mantelraum. *2.* Kalorimeterraum. *3.* Leitung vom Mantelraum zum Manometer. *4.* Manometer. *5.* Luftbehälter. *6.*, *7.* Vorrichtung zum Heben des Kalorimeters, um den Zutritt in den Kalorimeterraum herzustellen. Die Flüssigkeit in der Rinne *8* schließt den Kalorimeterraum ab. *9.*, *10.* Ab- und Zufuhr der Ventilationsluft.

Die Luftkalorimeter nach *d'Arsonval* (Fig. 333) und nach *Rubner* (Fig. 334) stellen den einfachsten Typus eines Strahlungskalorimeters dar. Rings um den Kalorimeterraum befindet sich ein Luftmantel, welcher zwischen zwei konzentrischen Metallzylindern eingeschlossen ist. Der Mantelraum steht entweder mit einem Manometer (Fig. 333) oder mit einem Volumeter

[1]) *Scharling,* Journ. f. prakt. Chemie. Bd. **48**. S. 435 (1849).

[2]) *Hirn,* Recherches sur l'équivalent mécanique de la chaleur. Colmar 1858.

[3]) *d'Arsonval,* Recherches de Calorimétrie. Journ. de l'anat. et de la physiol. T. **22**. p. 113 (1886).

[4]) *Rubner,* Ein Kalorimeter für physiologische und hygienische Zwecke. Zeitschr. f. Biol. Bd. **25**. S. 400 (1889). — Derselbe, Kalorimetrische Methodik. Festschrift zu *Ludwigs* 50jährigem Doktorjubiläum. Marburg 1890.

[5]) *Rosenthal,* Kalorimetrische Untersuchungen. Arch. f. Physiol. S. 1 (1889); S. 223 (1894); S. 191 (1897).

[6]) *Haldane, White* and *Washburn,* An improved form of animal calorimeter. Journ. of Physiol. Vol. **16**. p. 123 (1894).

[7]) *Henriques,* Ein neues Kalorimeter. Zentralbl. f. Physiol. Bd. **16**. S. 261 (1902).

(Spirometer, Fig. 334) in Verbindung. Durch den Kalorimeterraum wird ein Luftstrom gesaugt. Von derjenigen Wärmemenge, welche das Versuchsindividuum abgibt, wird ein Teil mit diesem Ventilationsstrom fortgeführt. Wenn man die Ventilationsgröße, die Temperatur und die Feuchtigkeit der Luft beim Eintritt und beim Austritt aus dem Kalorimeterraum kennt, kann man diese Wärmemenge berechnen. Der größte Teil der abgegebenen Wärmemenge wird durch die Wände des Kalorimeters — Metallzylinder und Luftmantel — auf die Umgebung übertragen. Durch eine empirische Graduierung des Apparates kann diese Wärmemenge aus dem Ausschlag des Manometers oder des Volumeters ermittelt werden.

Wir stellen uns vor, daß der ganze Kalorimeter dieselbe Temperatur hat wie die Umgebung. Jetzt wird eine Wärmequelle in den Kalorimeter hineingebracht. Die Temperatur des Kalorimeterraumes fängt zu steigen an, und ein nach außen gerichteter Wärmestrom kommt zustande. Wenn die Temperatur der Umgebung konstant gehalten wird und die Wärmequelle unverändert bleibt, stellt sich nach einiger Zeit ein **stationärer Zustand** ein, bei welchem die gleiche Wärmemenge pro Zeiteinheit durch die Wände des Kalorimeters befördert wird, welche die Wärmequelle im Kalorimeterraum abgibt.

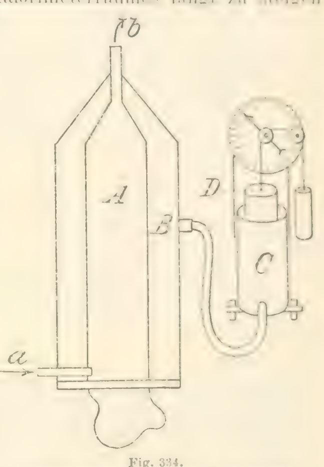



Fig. 334.
Luftkalorimeter nach *Rubner*. A Kalorimeterraum, der durch die Leitungen a und b ventiliert wird. *B* Mantelraum. *C* Volumeter, nach dem Prinzipe des Spirometers konstruiert. Die äquilibrierte Glocke *D* schwimmt in Petroleum. Die Hebung oder Senkung der Glocke wird von einem Zeiger angegeben.

Der Luftmantel, welcher den Kalorimeterraum vollständig umschließt, erfährt durch den genannten Wärmestrom eine Temperatursteigerung, welche einen Ausschlag an dem mit dem Mantelraume verbundenen Manometer oder Volumeter bewirkt. Die Temperatur der im Mantelraume eingeschlossenen Luft steigt, bis der erwähnte stationäre Zustand eingetreten ist. Jedem Ausschlage an dem Manometer bzw. Volumeter entspricht also eine bestimmte Wärmeentwicklung im Kalorimeterraume, pro Zeiteinheit gerechnet. Sowohl theoretische Überlegungen wie direkte Beobachtungen *(Rubner)* erweisen, daß die Temperatursteigerung im Mantelraume nicht notwendig der Größe der Wärmeentwicklung im Kalorimeterraume proportional ist. Durch geeignete Konstruktion des Apparates kann aber eine solche Proportionalität innerhalb weiter Grenzen erreicht werden, und es ist immer möglich, den betreffenden Apparat empirisch zu gradieren.

Zu diesem Zwecke kann man in folgender Weise verfahren *(Rubner)*: In den Kalorimeterraum wird das spiralförmige Rohr *S* (Fig. 335) eingeführt. Durch dieses Rohr leitet man einen genau regulierten Strom von warmem Wasser. Die Temperatur des Wassers

wird sowohl beim Eintritt *(E)* wie beim Austritt *(A)* aus' dem Kalorimeter bestimmt. Man berechnet hieraus die pro Zeiteinheit zum Kalorimeter abgegebene Wärmemenge. Wenn der Kalorimeterraum gleichzeitig ventiliert wird, zieht man die mit dem Ventilationsstrom fortgeführte Wärmemenge ab. In der angegebenen Weise kann man dem Kalorimeter sukzessive verschiedene Wärmemengen pro Zeiteinheit zuführen. Man wartet

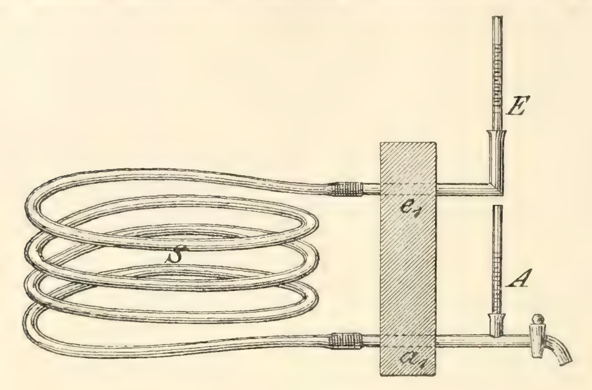



Fig. 335.
Vorrichtung zur Aichung des Luftkalorimeters *(Rubner)*.

jedesmal den Eintritt des stationären Zustandes ab und liest dann am Volumeter diejenige Gradzahl ab, welche der betreffenden Wärmeentwicklung entspricht.

Die Ausschläge des Volumeters bzw. Manometers können auf einem rotierenden Zylinder aufgeschrieben werden. Man erhält in dieser Weise eine Kurve (Fig. 336), deren Ordinaten die jeweilige Intensität der Wärmeentwicklung (Kalorien pro Zeiteinheit) im Kalorimeterraum angeben. Es ist aber zu bemerken, daß diese Kurve infolge der Trägheit des Apparates die einzelnen Schwankungen der Wärmequelle im Kalorimeter nicht vollkommen treu wiedergeben kann. Durch Flächenmessung kann man aber die in einem längeren Zeitabschnitt entwickelte Wärmemenge ermitteln. Hat die Aichung des Apparates erwiesen, daß die Ausschläge der Wärmeentwicklung proportional sind, so kann man die von dem betreffenden Apparate geschriebene Kurve direkt für die Flächenmessung anwenden. Sonst muß man die Kurve entsprechend den Ergebnissen der Aichung erst transponieren.

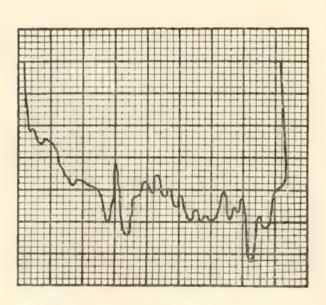


Fig. 336.

Außer von der Temperatur im Mantelraume wird der Volumeter bzw. Manometer auch von Schwankungen des Luftdruckes und von zufälligen

Temperaturschwankungen in der Umgebung beeinflußt. Um diese Fehlerquellen auszuschließen, hat man verschiedene Vorrichtungen eingeführt.

Fig. 337 stellt den Differentialkalorimeter von *d'Arsonval* dar. Er besteht aus zwei möglichst gleichen Kalorimetern. In den einen wird das Versuchsindividuum eingeführt; der andere bleibt leer. Die Glocken der beiden Volumeter sind an den Enden eines Wagebalkens aufgehängt, dessen Ausschläge die Temperaturdifferenzen zwischen den Mantelräumen der beiden Kalorimeter angeben.

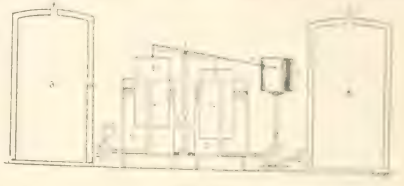


Fig. 337.
Differentialkalorimeter nach *d'Arsonval*. 1 Wagebalken, [illegible] dessen Enden die untereinander [illegible] 2, 2' aufgehängt sind. Die Gefäße [illegible] und stehen miteinander in Verbindung [illegible] raum. 9, 9' Mantelraum. 7 Rotierender Zylinder, [illegible] die Ausschläge des Wagebalkens aufgeschrieben werden.

In Fig. 338 wird der *Rubner*sche Luftkalorimeter mit Korrektionsapparat schematisch dargestellt. Der eigentliche Kalorimeter, welcher, wie oben angeführt, aus Kalorimeterraum *(R)* und Mantelraum *(M)*, der letztere in Verbindung mit einem Volumeter, besteht, ist in ein großes Wasserbad *(W)* versenkt. Das Wasser kommt aber nicht mit den Wänden des Mantelraumes in Berührung, sondern wird davon durch einen Isolierraum *(I)*, welcher Luft enthält, getrennt.[1]) In demselben Wasserbad befinden sich vier Luftbehälter *(C)*, welche teils miteinander, teils mit einem besonderen Volumeter in Verbindung stehen. Die Wände sämtlicher Räume sind aus Kupferblech. Durch besondere Vorrichtungen wird das Wasserbad bei konstanter Temperatur erhalten. Die Aufstellung des Wasserbades und der beiden Volumeter mit den rotierenden Zylindern zur Registrierung der

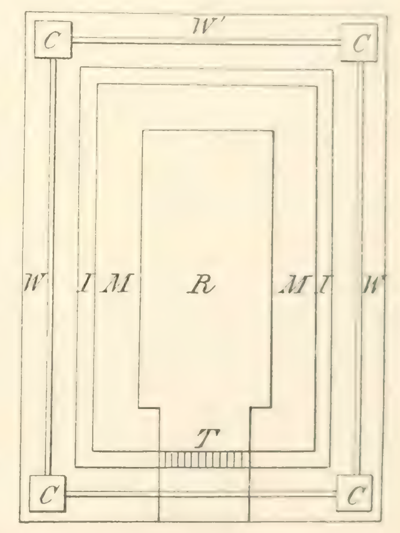



Fig. 338.
Schema des *Rubner*schen Luftkal[illegible] Korrektionsapparat. *R* Kalorimeterraum. *M* [illegible] *T* Türe. *C* Luftbehälter des Korr[illegible] *W* [illegible]

[1]) Die Empfindlichkeit des Kalorimeters wird hierdurch erhöht.

Ausschläge wird aus Fig. 339 ersichtlich. Die vier Luftbehälter *(C)* im Wasserbade mit zugehörendem Volumeter stellen einen Korrektionsapparat dar, welcher denselben Einflüssen ausgesetzt ist wie der Mantelraum *(M)* mit seinem Volumeter — den Einfluß der Wärmequelle im Kalorimeterraum ausgenommen. Die von dieser Wärmequelle abgegebene Wärmemenge ergibt sich also als die Differenz der Angaben der beiden Volumeter. Da aber der Mantelraum und der Korrektionsapparat ungleiche Luftvolumina einschließen, sind jene Angaben nicht direkt miteinander vergleichbar. Mittelst eines besonders bestimmten Koeffizienten lassen sich die Angaben des Korrektionsvolumeters auf den Mantelraumvolumeter umrechnen.

Fig. 340 gibt den Kompensationskalorimeter von *Haldane* wieder. Der Apparat besteht aus zwei Kalorimetern, welche in bezug auf Größe, Form und Einrichtung einander möglichst gleich sind. Jeder enthält Kalorimeter- und Mantelraum. In einer Leitung, welche die beiden Manteläume miteinander verbindet, ist ein Differentialmanometer eingeschaltet, der die geringsten Druckdifferenzen zwischen denselben angibt. In den einen Kalorimeterraum wird das Versuchstier hineingebracht, während in dem anderen eine Wasserstoffflamme brennt. Die Zufuhr des Wasserstoffes wird in der Weise geregelt, daß der Differentialmanometer sich unverändert hält. Unter diesen Verhältnissen entwickeln die beiden Wärmequellen, das Tier und die Wasserstoffflamme, gleiche Wärmemengen pro Zeiteinheit. Aus der verbrannten Wasserstoffmenge oder aus der gebildeten Wassermenge kann man also die Wärmeproduktion des Tieres während der betreffenden Versuchsperiode berechnen.

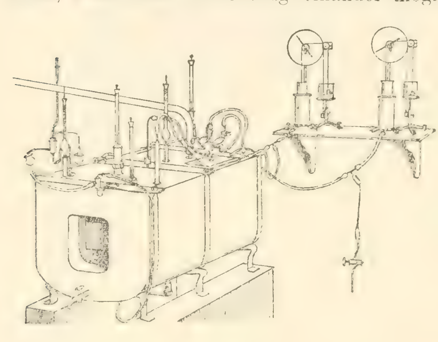


Fig. 339.
*Rubners* Luftkalorimeter mit Korrektionsapparat.

Durch jeden der beiden Kalorimeterräume wird ein Luftstrom gesaugt. Die Temperaturdifferenz zwischen der aus- und einströmenden Luft ist bei dem *Haldane*schen Apparate so gering, daß nur ein sehr geringer Teil der in den Kalorimeterräumen entwickelten Wärmemengen mit dem Ventilationsstrom entfernt wird. Dieser Wärmeverlust ist übrigens von der gleichen Größe in den beiden Kalorimetern.

Vor dem Eintritt in den Kalorimeterraum wird die Ventilationsluft getrocknet. Die ausgesaugte Luft wird ebenfalls durch ein Absorptionsgefäß geleitet, wo die aus dem Kalorimeterraum stammende Feuchtigkeit abgegeben wird. Die Gewichtszunahme des betreffenden Absorptionsgefäßes gibt also die Menge des gebildeten Wassers an. Bei der Berechnung der ent-

sprechenden Wärmeentwicklung muß man darauf Rücksicht nehmen, daß das Wasser als Dampf aus dem Kalorimeter entfernt wird. Unter

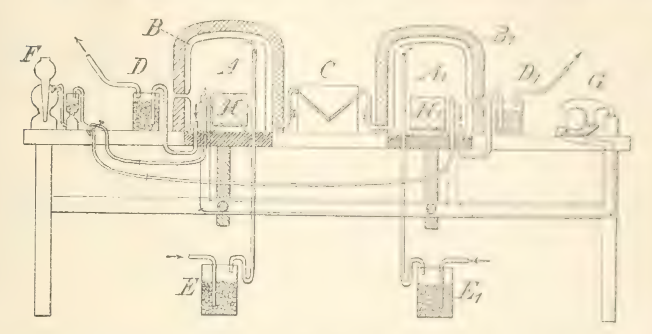



Fig. 340.

Kompensationskalorimeter von *Haldane*, *White* und *Washburn*. $A$, $A_1$ [illegible]. $B$, $B_1$ Mantelraum. Die Außenwände sind mit Filz bekleidet. $C$ [illegible] $D$, $D_1$ Absorptionsgefäße, in welchen die Feuchtigkeit der aus dem Kalorimeterraum ausströmenden Luft aufgenommen wird. $E$, $E_1$ Absorptionsgefäße, in welchen die Ventilationsluft vor dem Eintritt in den Kalorimeterraum getrocknet wird. $F$ Apparat für Wasserstoffentwicklung. $G$ Elektrischer Zündapparat für die Wasserstoffflamme. $H$, $H_1$ Käfig aus Drahtnetz für das Versuchstier. [illegible] Kalorimeterräume sind sowohl mit Tierkäfig wie mit Vorrichtungen zur Verbrennung von Wasserstoff ausgestattet.

diesen Verhältnissen hat man 3·2 Kalorien für jedes Gramm Wasser zu berechnen.

In den **thermo-elektrischen Strahlungskalorimetern** ist der Luftmantel und Volumeter durch thermo-elektrische Elemente und einen Galvanometer ersetzt.

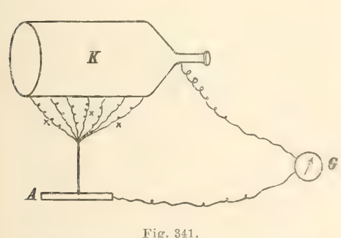



Fig. 341.

Thermo-elektrischer Kalorimeter nach *Henriques*. $K$ Kupferzylinder. [illegible] Konstantandrähte. $A$ Kupferplatte. $G$ *d'Arsonval*scher Galvanometer.

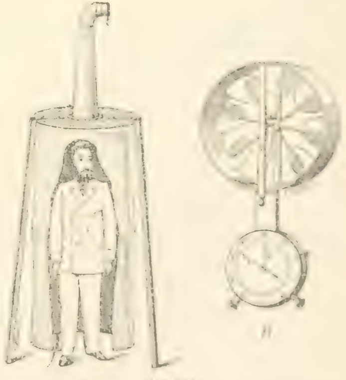



Fig. 342.

Anemokalorimeter von *d'Arsonval*. $A$ Kalorimeter. $B$ Anemometer.

Solche Apparate sind von *d'Arsonval* und von *Henriques* konstruiert worden. In Fig. 341 wird der von letzterem angegebene dargestellt. Der Kalorimeterraum wird von einem Zylinder $K$ aus dünnem Kupferblech be-

grenzt. An der Oberfläche dieses Zylinders sind Konstantandrähte angelötet. Diese Drähte, welche sämtlich dieselbe Länge haben müssen, vereinigen sich zu einem einzigen Draht, ebenfalls aus Konstantan, welcher an der Kupferplatte *A* festgelötet ist. Die Platte *A* und der Zylinder *K*, welche mittelst Kupferdrähten mit einem *d'Arsonval*schen Galvanometer *G* verbunden sind, werden in einen Thermostat angebracht. Durch einen elektrischen Ventilator wird für eine möglichst gleichmäßige Temperatur in dem Thermostaten gesorgt.

3. **Anemokalorimeter.** Das Prinzip dieser Kalorimeter geht aus der Fig. 342 hervor, welche einen von *d'Arsonval*[1]) beschriebenen Apparat darstellt. Die von der Versuchsperson abgegebene Wärmemenge bewirkt einen Luftstrom durch den Kalorimeterraum. Die Luft tritt am Boden desselben hinein und verläßt den Raum durch ein im Dache angebrachtes Rohr, welches als Schornstein wirkt. Das horizontale Endstück dieses Rohres enthält einen Anemometer, der die Geschwindigkeit des Luftstromes angibt. Die Anwendbarkeit des betreffenden Apparates hängt davon ab, inwieweit das Verhältnis zwischen der Stromgeschwindigkeit und der im Kalorimeterraum abgegebenen Wärmemenge sich empirisch feststellen läßt. Ein ähnlicher Apparat ist auch von *Ignatowski*[2]) beschrieben.

[1]) *d'Arsonval,* L'anémocalorimètre. Arch. d. physiol. T. **26**. p. 360 (1894).

[2]) *Ignatowski,* Ein neuer Typus eines klinischen Anemokalorimeters. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **102**. S. 217 (1904).

# Methoden beim Arbeiten mit sensibilisierenden fluoreszierenden Stoffen.

Von **H. v. Tappeiner,** München.

Zahlreiche biologische Objekte, welche durch sichtbares Licht wenig oder gar nicht verändert werden, verlieren bei Gegenwart geringer Mengen von fluoreszierenden Stoffen mehr oder weniger rasch ihre Vitalität resp. Aktivität. Man hat diese Wirkung als photodynamische Erscheinung oder Sensibilisierung bezeichnet.

Unter den **Zellen** sind am leichtesten zu beeinflussen verschiedene Protozoen (Paramaecien, Amöben, Trypanosomen), weniger die Zellen höherer Tiere (Flimmerepithel, Leukozyten, Erythrozyten) und die Schimmel-, Hefe- und Spaltpilze.

Unter den **„Toxinen“** sind Ricin, Diphtherie- und Tetanustoxin (zunächst unter Umwandlung in „Toxoïd“) rasch veränderbar, desgleichen verschiedene Hämolysine der Bakterien und der Samen höherer Pflanzen, während Toxine anderer Art, z. B. jene der Schlangen, viel resistenter sind.

Allen diesen Wirkungen, Veränderungen liegen Oxydationsprozesse zugrunde. Man muß dies aus der Tatsache schließen, daß die Beschleunigung der einfachen Lichtwirkung durch fluoreszierende Stoffe bei den aufgeführten biologischen Objekten nur statthat, wenn Sauerstoff zugegen ist, und daß auch die photochemische Zersetzung verschiedener anorganischer und organischer Substanzen bekannter Konstitution eine analoge Beschleunigung unter Bildung faßbarer Oxydationsprodukte erfährt. Zu beachten bleibt indes, daß auch ein Prozeß bekannt ist, wo die Sauerstoffgegenwart nicht bloß nicht notwendig, sondern geradezu von hemmendem Einfluß ist: Umsetzung (Oxydation — Reduktion) des *Eder*schen Gemisches von Ammoniumoxalat und Quecksilberchlorid zu Kohlensäure und Quecksilberchlorür.

Auch die **Enzyme** zeigen kein gleichmäßiges Verhalten. Invertase, Diastase, Chymase und Zymase verlieren sehr rasch ihre spezifische Wirksamkeit, wogegen der Einfluß auf die Oxydationsfermente (Katalase, Peroxydase) viel geringer ist.

Zwischen der Empfindlichkeit der biologischen Objekte zu ultraviolettarmem Licht allein und zu dem Systeme Licht + fluoreszierende Substanz

besteht anscheinend keine einfache Beziehung. Einige Substrate, z. B. Invertase, sind wenig lichtempfindlich, aber stark sensibilisierbar, andere (Peroxydase, Katalase) sind deutlich lichtempfindlich, aber relativ wenig sensibilisierbar, wieder andere sind gegen Licht allein und in Verbindung mit fluoreszierender Substanz in nahezu gleichem Grade resistent (Hämolysin und Neurotoxin des Kobragiftes). Diese Differenzen würden einer Erklärung eher zugänglich sein, unter der Annahme, daß das Primäre der Lichtwirkung bei biologischen Objekten ein Spaltungsvorgang sei, welchem sekundär die Oxydation folgte. Die sensibilisierende Wirkung der fluoreszierenden Stoffe würde darin bestehen, daß sie diese Oxydation und damit auch den ganzen Prozeß beschleunigten.[1])

Nach dieser kurzen Orientierung über das Gebiet sei auf die wichtigsten Punkte, welche bei photodynamischen Arbeiten mit fluoreszierenden Stoffen in Betracht kommen, eingegangen.

## Lichtquelle.

Bei empfindlichen Objekten genügt zerstreutes Tageslicht, bei weniger empfindlichen muß, um rasche Wirkung zu erhalten, intensives Licht genommen werden, entweder Sonnenlicht oder künstliche Lichtquellen, welche reich sind an Strahlen, für welche die verwendete fluoreszierende Substanz Absorption besitzt. Letztere haben den Vorteil, daß man bei Vornahme ausgedehnter Versuchsreihen wenigstens annähernd mit gleichbleibender Lichtstärke arbeiten kann. Eine Kohlenbogen-Reflektorlampe von 20—30 Ampère, wie sie bei Projektionsapparaten verwendet wird, ist für die meisten Zwecke geeignet. Sie wirkt zwar nicht so intensiv wie der bekannte *Finsen*sche Konzentrationsapparat, läßt aber die Bestrahlung größerer Oberflächen, z. B. von Flüssigkeiten, welche nachher einer chemischen Untersuchung unterworfen werden sollen, zu.

Um bei Anwendung der genannten intensiven Lichtquellen die Lichtwirkung rein zu bekommen, ist es notwendig, die infraroten Strahlen vorher zu absorbieren. Man läßt das Licht zu diesem Zwecke durch eine Schicht von Wasser von mindestens 10, besser 30 *cm* Dicke gehen. Berieselung der Belichtungskammer mit kaltem Wasser in dünner Schicht genügt nicht, da dadurch wohl die Wirkung der durch die Umsetzung in Wärme erzeugten zu hohen thermometrischen Temperatur, nicht aber die Wirkung der infraroten Strahlen selbst ausgeschlossen werden kann. Noch besser als Wasser ist eine 5—6 *cm* dicke Schicht einer frisch mit ausgekochtem Wasser bereiteten angesäuerten Lösung von 7% Ferrosulfat, welche nach *R. Zsigmondy*[2]) die infraroten Strahlen bis auf 1—2% der gesamten

[1]) *H. v. Tappeiner,* Die photodynamische Erscheinung (Sensibilisierung durch fluoreszierende Stoffe). Ergebnisse des Physiologie. Herausgegeben von L. Ascher und K. Spiro. VIII. Jahrgang. S. 698—741 (1909). Wiesbaden. Enthält ein Referat über sämtliche, bis Ende 1908 erschienenen Arbeiten dieses Gebietes.

[2]) Über die Diathermanität wässeriger Eisenoxydulsalzlösung. *Wiedemanns* Ann. Bd. **49**. S. 533.

Strahlung absorbiert. Alte Lösungen, welche schon viel Ferrisulfat enthalten, sind nicht mehr geeignet.

Hat die fluoreszierende Substanz, welche man in Verwendung ziehen will, ihr Absorptionsgebiet erst jenseits des gelben Teiles des Spektrums, gegen Violett zu, so kann man auch gesättigte Kupfervitriollösung als Vorlage benutzen. Selbe absorbiert in 4·5 *cm* dicker Schicht die Strahlen bis zur Wellenlänge 560 $\mu\mu$ vollständig, bei 540 $\mu\mu$ noch teilweise, schaltet also außer den infraroten die roten, orangen und einen Teil der gelben Strahlen bis etwas über *D* ½ *E* aus.

Verwendet man Wasser als Lichtfilter und eine Reflektorbogenlampe als Lichtquelle, so benutzt man zweckmäßig ein „Kühlgefäß" mit Spiegelglaswänden, wie es den Projektionsapparaten beigegeben wird. Bei Verwendung von Sonnenlicht läßt man sich flache, oben offene Kasten in Metallfassung mit einer Spiegelglasscheibe als Boden herstellen (z. B. 25 *cm* im Geviert, 30 *cm* hoch) oder nimmt steilbordige Glasschalen mit ebenem, gleichmäßigem Boden (ausgesuchte Kristallisationsschalen), unter welchen die zu bestrahlenden Objekte aufgestellt werden, wenn man es bei in Röhren eingeschlossenen Objekten nicht vorzieht, sie in ein geräumiges tiefes Wasserbecken zu versenken. Bei Verwendung eines Heliostaten kann man die schief einfallenden Sonnenstrahlen voll zur Ausnutzung bringen.

„Kühlgefäße" ganz aus Glas resp. aus Glasplatten zusammengefügt benutzt man auch, wenn man Eisen- oder Kupfersulfatlösung als Filter wählt. Sie müssen in letzterem Falle sehr sorgfältig gedichtet sein. Gewöhnlicher Glaserkitt, den man 2—3 Wochen lang bei gewöhnlicher Temperatur trocknen läßt, hat sich am besten bewährt.

Bei vergleichenden Versuchen über die Wirkung der ultravioletten Strahlen und des Systems Licht + fluoreszierende Substanz dürfen Filterbehälter aus Glas wegen der bekannten Undurchlässigkeit des Glases für Ultraviolett nicht angewendet werden. Da Gefäße aus Quarzplatten viel zu teuer sind, wenn man Objekte größeren Umfanges bestrahlen will, so hilft man sich am einfachsten dadurch, daß man die zu belichtenden Objekte in Quarzcuvetten eingeschlossen in ein tiefes, mit salzarmem Wasser gefülltes Gefäß einsenkt. Benutzt man z. B. die Quarzglasquecksilberlampe von *Heraeus* als Lichtquelle, so bringt man selbe über dem Wasserspiegel an; gebraucht man eine Kohlenbogenreflektorlampe, so bewirkt man den senkrechten Einfall ihrer Strahlen durch einen Spiegel aus Magnalium, welche Metallegierung die Eigenschaft hat, nur wenig Ultraviolett bei der Reflexion zu verschlucken. Die gleichmäßige Belichtung der Cuvetten durch diese Lichtquellen wird dadurch gesichert, daß man das Wassergefäß um eine senkrechte Achse durch einen Motor drehbar einrichtet.

Fig. 343 zeigt im Durchschnitt die Anordnung bei Benutzung einer Bogenreflektorlampe. *a* ist die Lampe, *b* der Magnaliumspiegel, *c* das Wassergefäß mit siebartig durchlöcherter Tragplatte für die Cuvetten.[1])

[1]) *A. Jodlbauer* und *H. v. Tappeiner*, Über die Wirkung des ultravioletten Lichtes auf Enzyme. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 87. S. 373 [illegible]

## Belichtungsgefäße.

Belichtungen in zerstreutem Tageslicht von Zellen, welche man nur mikroskopisch zu untersuchen hat, also nur in einer beschränkten Anzahl von Exemplaren zu belichten braucht, werden entweder in Uhrschälchen oder im hängenden Tropfen in feuchter Kammer (wirksamere Anordnung) vorgenommen. Belichtungen von größeren Massen, Lösungen und Zellensuspensionen, die man nachher chemisch untersuchen will, nimmt man in offenen resp. nur durch Wattepfropfen vor Staubeinfall geschützten Flaschen oder Reagenzröhren vor, die an einem der Sonne nicht zugänglichen Fenster so aufgestellt werden, daß das Tageslicht allseitig Zutritt hat.

Bei Belichtungen mit intensiver Lichtquelle gewähren aus Spiegelglasplatten zusammengestellte flache Kammern (Cuvetten) die

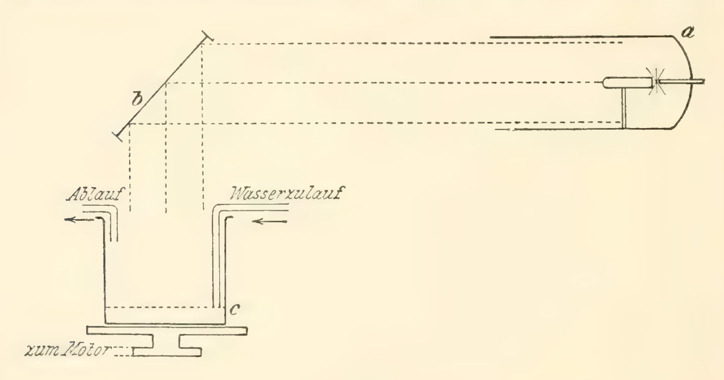



Fig. 343.

beste Lichtausnutzung. Da zur Wirkung Sauerstoff notwendig ist, dürfen sie nicht vollgefüllt werden. Bei horizontaler Lagerung, wie sie bei senkrechtem Einfall des Lichtes (s. Fig. 343) notwendig ist, beschlägt sich die von der Flüssigkeit nicht bedeckte obere Platte, wenn die Temperatur innen und außen nicht vollständig gleich ist, leicht in einem Grade, daß die aufgenommene Lichtmenge sich verändert und mit mehreren Cuvetten gleichzeitig unternommene vergleichende Versuche fehlerhaft werden.

Zu vergleichenden Versuchen mit ultraviolettem Licht unter Füllung mit bestimmten Gasen sind folgende Bestrahlungsgefäße von ca. 48 $cm^3$ Rauminhalt

S. 197 (Leipzig). Die in genanntem Archive über Lichtwirkung veröffentlichten Untersuchungen aus dem pharmakolog. Institute München sind auch gesammelt in einer Sonderausgabe, erschienen unter dem Titel: *H. v. Tappeiner* und *A. Jodlbauer,* Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Leipzig, F. C. W. Vogel, 1907. Die unter „Sonderausgabe“ angeführten Zitate beziehen sich darauf.

erprobt worden (Fig. 344), angefertigt von Steinheil Söhne, optisch-astronomische Werkstätte, München.[1])

Sie waren aus je einer planparallelen Quarzplatte von 6 *mm* Dicke, einer eben solchen Platte aus gewöhnlichem Crownglas und aus einem ringförmigen Glaskörper von 6 *cm* innerem Durchmesser und 2 *cm* Höhe zusammengestellt. Letzterer war an einer Stelle durchbohrt zur Aufnahme des aus einem Stücke gefertigten gläsernen Doppelrohres mit Schaumkugel, das die Zu- und Abfuhr der Gase zu vermitteln hatte. Die 4 Stücke waren ursprünglich aufeinander geschliffen. Da diese Vereinigungsweise indes nicht volle Garantie für stundenlange Dichtigkeit gewährte, wurden sie mit einer feinen Kittlage fix miteinander verbunden. Die Kammern hielten nun das Quecksilbervakuum beliebig lange. Die Reinigung der Gefäße war durch diese Verkittung der Teile zwar erschwert, sofort nach dem Gebrauche vorgenommen indes sicher erreichbar. Die Kammer befand sich in einer schweren Metallfassung mit Fuß, auf dem sie während der Füllungsoperation stand. Bei der Belichtung (unter Wasser) wurde sie horizontal gelegt, mit der Quarzplatte nach unten oder oben (gegen die Lichtquelle gerichtet), je nachdem man nur sichtbares oder auch ultraviolettes Licht einwirken lassen wollte.[2])

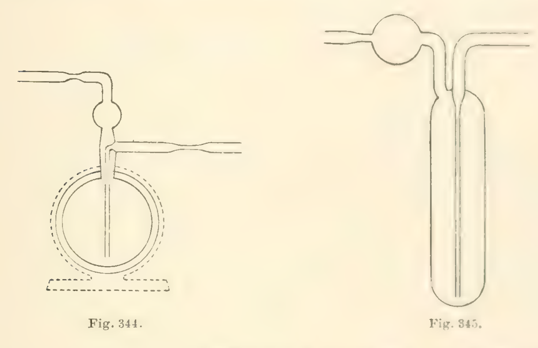


Fig. 344. Fig. 345.

An Stelle der auch sonst Übelstände bietenden, aus einzelnen Stücken zusammengesetzten Cuvetten (schwierige Reinigung, Dichtung, beschränkte Kapazität) treten in vielen Fällen Glasröhren, welche man nebeneinander der Lichtquelle gegenüber aufstellen kann, eventuell wenn man das Licht nicht schon vorher durch ein Strahlenfilter „gekühlt“ hat, versenkt in eine große Wanne, so daß eine 20—30 *cm* hohe Schichte von fließendem Wasser darüber steht. Bei Belichtungen von Flüssigkeiten in luftleerem resp. mit bestimmten Gasen gefülltem Raume haben sich die in Fig. 345 abgebildeten Glasröhren von 100 $cm^3$ Inhalt, aus einem Stück

[1]) *A. Jodlbauer* und *H. v. Tappeiner*, Über die Wirkung des ultravioletten Lichtes auf Enzyme. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 87. S. 373 (1906) und „Sonderausgabe“ S. 195, 196.

[2]) Quarzkammern anderer Konstruktion sind nach Abschluß des Manuskriptes von *K. A. Hasselbach*, Untersuchungen über die Wirkung des Lichtes auf Blutfarbstoffe und rote Blutkörperchen wie auch über optische Sensibilisation für diese Lichtwirkungen. Biochem. Zeitschr. Bd. 19. S. 435 (1909) beschrieben worden. (Anmerkung bei der Korrektur.)

geblasen, bewährt.[1]) Sie dürfen mit kolloidalen (schäumenden) Lösungen nur bis höchstens $^1/_3$ gefüllt werden. Bei genauen vergleichenden Versuchen, wo es auf ganz gleichmäßige Belichtung und Sauerstoffversorgung ankommt, ist es zweckmäßig, die Röhren auf einer rotierenden Scheibe radial oder tangential zu befestigen (Fig. 346).

Durch die Umdrehung erfährt dann jede Röhre eine gleichmäßige Schüttelung und gleichmäßige Belichtung. Auf diese Weise können große Mengen von Flüssigkeiten oder Zellensuspensionen, z. B. rote Blutkörperchen, belichtet werden.[2])

## Auswahl der Stoffe und Konzentration derselben.

Im allgemeinen zeigen alle Stoffe, welche die Fähigkeit haben, in wässeriger Lösung in geringem oder stärkerem Grade zu fluoreszieren, die photodynamische Erscheinung.

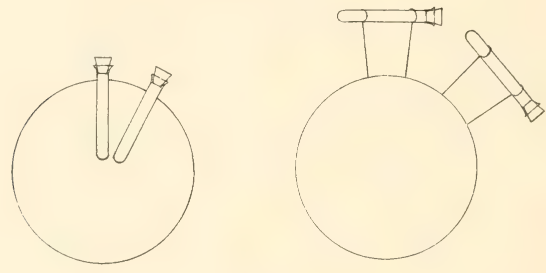


Fig. 346.

Sie wirken jedoch nicht in gleicher Intensität, manche von ihnen auch nicht auf alle Objekte. So ist die Dichloranthracendisulfosäure nur schwach wirksam bei Hefe, Schimmelpilzen und Bakterien, unwirksam bei aus Meerrettig dargestellter Peroxydase, wogegen die Katalase aus Blut oder Fettgewebe von diesen Stoffen stark angegriffen wird. Das bei Zellen und mehreren Enzymen versagende Äsculin und die Fluoridindisulfosäure sind wirksam bei anderen Enzymen und bei Jodkalium usw. Auf diese Differenzen kann eventuell ein Trennungsverfahren von Enzymen und Zellen und von Enzymen untereinander gegründet werden.

[1]) *A. Jodlbauer* und *H. v. Tappeiner*, Über die Wirkung des Lichtes auf Enzyme in Sauerstoff- und Wasserstoffatmosphäre, verglichen mit der Wirkung der photodynamischen Stoffe. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 85. S. 386 (1905) und „Sonderausgabe" S. 116.

[2]) *H. v. Tappeiner*, Über die Beziehung der photodynamischen Wirkung der Stoffe der Fluoreszeïnreihe zu ihrer Fluoreszenzhelligkeit und ihrer Lichtempfindlichkeit. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 86. S. 479 (1906) und „Sonderausgabe" S. 157.

Von den fluoreszierenden Stoffen, welche die stärkste und vielseitigste Wirkung haben[1]), seien die folgenden genannt:

1. Methylenblau (zinkfreies Chlorid, Molekulargewicht 319·5), und Methylenviolett (Dimethylthionolinchlorid, Molekulargewicht 292·5). Fluoreszenz rot, Absorption rot bis gelb. (Bezugsquelle: Badische Anilin- und Sodafabrik.) Ersteres ist für Protozoen (Paramaecien) sehr stark giftig, letzteres viel weniger und daher für diese Objekte vorzuziehen. Beide sind in neutralen und sauren Lösungen verwendbar.

2. Stoffe der Fluoreszeïnreihe. Sie absorbieren im gelben und grünen Bezirk des Spektrums. Die stärkste Wirkung besitzt das Tetrachlortetrajodfluoreszeïn (Rose bengale) respektive seine Natronverbindung (Molekulargewicht 1017); es lassen sich aber schon durch das Tetrabromfluoreszeïn-Natrium (Eosin, Molekulargewicht 692) starke Wirkungen erzielen.

Diese Stoffe sind nur in alkalisch oder neutral reagierenden Flüssigkeiten brauchbar, weil in sauren die freien Farbstoffe ausfallen. Man kann diese Wasserunlöslichkeit der Farbsäuren dazu benutzen, um den Farbstoff nach der Belichtung abzutrennen, wenn er bei einer eventuell folgenden chemischen Untersuchung stören sollte.

3. Säuren der Anthracen- und Anthrachinonreihe. Ungefähr gleichstarke Wirkung wie das obengenannte Rose bengale der Fluoreszeïnreihe besitzt das lebhaft blau fluoreszierende Dichloranthracen-2·7-disulfosaure Natron (Molekulargewicht 451). Absorption im Blau bis Ultraviolett. Für einzelne Objekte von noch stärkerer Wirkung ist das nur sehr schwach fluoreszierende 2·7-Anthrachinondisulfonsaure Natron (Molekulargewicht 412); es oxydiert im Lichte nach noch nicht veröffentlichten, im pharmakologischen Institute angeführten Untersuchungen beispielsweise Glyzerin annähernd ebenso intensiv, wie dies von Uranylsulfat gefunden wurde.[2])

Beide Stoffe sind in Flüssigkeiten jeder Reaktion brauchbar, auch in sauren, weil die freien Säuren in Wasser leicht löslich sind und daher wirksam bleiben. Bezugsquelle: Farbenfabriken vormals Friedrich Bayer & Co.

Bezüglich der Konzentration, in der die fluoreszierenden Stoffe die stärkste Wirkung zeigen, haben darauf gerichtete Untersuchungen[3]) folgendes ergeben:

---

[1]) *H. v. Tappeiner* und *A. Jodlbauer*, Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 80 S. 427 (1904) und „Sonderausgabe" S. 6—25 u. 27—36. — *H. v. Tappeiner*, Das photodynamische und optische Verhalten der Anthrachinone. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 82. S. 217 (1905) und „Sonderausgabe" S. 66. — *A. Jodlbauer* und *H. v. Tappeiner*, Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Toxine. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 85 S. 399 (1905) und „Sonderausgabe" S. 139.

[2]) *C. Neuberg*, Chemische Umwandlungen durch Strahlenarten. I. Biochem. Zeitschrift. Bd. 13. S. 305 (1908).

[3]) *A. Jodlbauer* und *H. v. Tappeiner*, Über die Abhängigkeit der Wirkung der fluoreszierenden Stoffe von ihrer Konzentration. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 86 S. 468 (1906) und „Sonderausgabe" S. 146.

Bei den Stoffen der Fluoreszeïnreihe und bei Methylenblau nimmt die Wirkung zunächst mit sinkender Konzentration zu bis zu einem Maximum, das zwischen den molekularen Konzentrationen von $^1/_{2000}$ und $^1/_{10000}$ gelegen ist, näher an ersterer. Von da an sinkt mit weiter fallender Konzentration die Wirkung wieder, bis sie in Verdünnung von mehreren Millionen schließlich gleich Null wird. Konzentrationen im Intervalle von $^1/_{2000}$ bis $^1/_{10000}$ normal sind somit am geeignetsten. Hat auf die Belichtung eine chemische Untersuchung zu folgen, so ist es im allgemeinen geraten, nahe an der unteren Grenze zu bleiben, weil dann die Anwesenheit der Farbstoffe weniger stört.

Bei dem dichloranthracen- und anthrachinondisulfosauren Natron besitzen die höchsten Konzentrationen die stärkste Wirkung, von da ab sinkt dieselbe kontinuierlich. Es läßt sich aber noch in Konzentrationen von $^1/_{1000}$ bis $^1/_{10000}$ normal immerhin noch eine starke Wirkung erzielen, so daß es meist völlig genügt, diese letzteren zu verwenden. Um die Herstellung solcher Normallösung bequem zu gestalten, wurde oben bei Besprechung der einzelnen Stoffe auch deren Molekulargewicht angegeben.

Auf die als Bleichung bezeichnete photochemische Oxydation der fluoreszierenden Stoffe ist zu achten, denn sie bedingt eine steigende Abnahme ihrer Wirksamkeit. Die hier aufgeführten Stoffe sind indes sämtlich wenig lichtempfindlich, so daß ihre Veränderung erst bei langdauernden Belichtungen mit intensivem Licht in Betracht kommt.

Schließlich sei noch auf die Hemmung der Sensibilisierung durch Serum und andere eiweißreiche Flüssigkeiten die Aufmerksamkeit gelenkt, von der namentlich zellige Gebilde, in geringerem Grade auch Enzyme betroffen werden. Sie ist die Folge einer adsorptiven Bindung der fluoreszierenden Stoffe. Durch starke Verdünnung resp. Alkalisierung kann sie nahezu vollständig aufgehoben oder am Zustandekommen verhindert werden.[1])

[1]) *Gunni Busck*, Die photobiologischen Sensibilisatoren und ihre Eiweißverbindungen. Biochem. Zeitschr. Bd. **1**. S. 425 (1906) und *A. Jodlbauer* und *T. Kudo*, Die Dunkelwirkung fluoreszierender Stoffe auf Eiweiß, Toxine und Fermente und ihre Reversibilität. Biochem. Zeitschr. Bd. **13**. S. 24 (1908).

# Die wichtigsten Methoden der künstlichen Parthenogenese.

Von **Jacques Loeb** (Berkeley, California).

1. Die Methoden der künstlichen Parthenogenese beim Seeigelei. Die nötigen Instrumente sind: eine Anzahl kräftiger chirurgischer Scheren zum Öffnen der Seeigel und ein kleiner Löffel aus Glas oder aus Muschelschale zum Herausnehmen der Ovarien. Es ist wünschenswert, daß die Ovarien nicht mit Metallen oder Metalloxyden oder -salzen in Berührung kommen. Aus demselben Grunde ist es wünschenswert, wenn auch nicht unerläßlich, daß das zu den Versuchen zu benutzende Seewasser in Glas direkt aus dem Ozean geschöpft und nicht aus der metallenen Aquariumsleitung entnommen wird. Das Seewasser muß filtriert und, um etwa vorhandene Spermatozoen abzutöten, auf etwa 50° erhitzt und dann wieder abgekühlt werden.

Bevor man einen Seeigel öffnet, bringt man ihn unter einen Strahl Süßwasser, um etwa an der Oberfläche haftende Spermatozoen abzuwaschen. Dann öffnet man den Seeigel, um die Ovarien herauszunehmen. Das Öffnen geschieht am besten in der folgenden Weise: Man führt den spitzen Schenkel einer kräftigen Schere in die Mundöffnung des Seeigels und schneidet radial etwa einen bis zwei Zentimeter ein (je nach der Größe des Seeigels mehr oder weniger weit) und schneidet dann diesem Radius entsprechend ein kreisrundes Stück, mit dem Mund als Zentrum, aus der Schale des Seeigels heraus. Sobald dieses Stück entfernt ist, sieht man die Geschlechtsdrüsen und kann dann meist nach der Farbe entscheiden, ob das geöffnete Exemplar ein Weibchen ist. Ist das der Fall, so gestaltet sich das weitere Verfahren folgendermaßen. Man läßt den Inhalt der Körperhöhle aus der Öffnung auslaufen und befreit die Körperhöhle von Fäkalmassen durch nicht zu kräftiges Herausschleudern des Inhaltes aus der Körperhöhle. Dann nimmt man die Ovarien mit dem Glaslöffel, der die geeignete Größe besitzen muß, einzeln heraus. Jedes Ovarium wird dann in einer Schale mit etwa 200 $cm^3$ Seewasser abgewaschen und dann in eine Schale mit etwa 50 $cm^3$ Seewasser gebracht. Die Eier fließen zur Zeit der Reife spontan aus dem Ovarium und nur diese Eier sollen zu Versuchen benutzt werden.

Ist der geöffnete Seeigel ein Männchen, so muß der Experimentator Hände und Instrumente sofort sterilisieren, da sonst die Kulturen leicht mit Samen infiziert werden. Zum Sterilisieren der Hände genügt Abwaschen derselben mit Seife und gründliches Trocknen derselben. Die Instrumente werden in der Weise desinfiziert, daß man sie in Süßwasser legt und dann gründlich abtrocknet. Dazu ist es nötig, die Scherenschenkel auseinander zu nehmen. Es ist wesentlich, daß die Eier unmittelbar nach der Herausnahme zu dem Versuch benutzt werden. Nur auf Eis lassen sie sich einige Stunden oder vielleicht etwas länger für den Versuch brauchbar erhalten. Ebenso ist es unerläßliche Vorbedingung, daß die Seeigel selbst vor dem Versuch nicht an Sauerstoffmangel leiden. Wo es tunlich ist, entnimmt man am besten die Seeigel für jeden Versuch frisch aus dem Ozean.

Die Entwicklungserregung kann mit und ohne Membranbildung geschehen. Um die Membranbildung hervorzurufen, mischt man 2 : 8 *cm*³ einer $^{n}/_{10}$ einbasischen Fettsäure (z. B. Buttersäure) mit 50 *cm*³ Seewasser. (Gründliche Mischung nötig!) Dann werden die Eier in diese Mischung gebracht, und mit einer Pipette in derselben zerstreut, so daß jedes Ei sofort mit der Säure in Berührung kommt. Dann läßt man die Eier langsam zu Boden fallen. Sobald alle am Boden sind, bringt man dieselben durch mäßiges Rotieren des Gefäßes alle in das Zentrum des letzteren. Man kann dann mit der Pipette die Eier fast ohne anhaftende Säure in normales Seewasser zurückbringen. Dieses Übertragen der Eier in normales Seewasser geschieht bei 15° in anderthalb bis zwei Minuten. Man hat zu dem Zweck vier Schalen, jede mit 200 *cm*³ Seewasser, bereit stehen. Nach anderthalb Minuten überträgt man die erste Pipette voll Eier aus dem säurehaltigen in das normale Seewasser und alle halbe Minute wird eine neue Pipette mit Eiern in eine neue Schale übertragen. Man erhält auf diese Weise mit Sicherheit mindestens eine Schale, in der alle Eier eine völlig normale Befruchtungsmembran bilden.[1])

Da für jede Seeigelform andere Konzentrationen und Zeiten gewählt werden müssen, so ist es nötig, vor jedem Versuch mit einer Spezies die für dieselbe geltenden Zeiten und Säurekonzentrationen in der angegebenen Weise zu ermitteln. Bei zu kurzer sowohl wie bei zu langer Expositionsdauer bleibt die Membranbildung aus.

Nach der Behandlung mit Säure haben die Eier eine Tendenz zu agglutinieren. Man kann das Agglutinieren der membranhaltigen Eier dadurch verhindern, daß man dieselben von Zeit zu Zeit leicht mit der Pipette in Bewegung erhält. Das Agglutinieren der Eier ist übrigens von keinen ernstlichen Folgen für den Erfolg des Versuches begleitet.

Etwa zehn Minuten nach der künstlichen Membranbildung bringt man die Eier in hypertonisches Seewasser. Als hypertonisches Seewasser dient in meinen Versuchen eine Mischung von 50 *cm*³ Seewasser und 7—8 *cm*³ $2^{1}/_{2}$ n-NaCl-Lösung. In dieser Lösung bleiben die Eier 30—50 Minuten.

[1]) *Loeb,* Untersuchungen über künstliche Parthenogenese. Leipzig 1906. S. 329.

Es ist nötig, daß man alle 3 oder 5 Minuten eine Portion Eier in eine besondere Schale mit normalem Seewasser überträgt. Trifft man die Dauer der Exposition nicht genau, so erhält man schlechte Resultate.[1] Bei zu kurzer Exposition entwickeln sich die Eier nicht und bei zu langer Exposition erhält man verkrüppelte Larven. Da die hypertonische Lösung wesentlich durch ihren Einfluß auf die Oxydationen wirkt, so ist es nötig, daß das hypertonische Seewasser genügende Mengen freien Sauerstoffs enthält[2], und daß nur relativ wenige Eier in ein Gefäß mit hypertonischem Seewasser kommen. Die Eier müssen in einer dünnen Schicht am Boden des Gefäßes liegen, damit sie sich den Sauerstoff nicht gegenseitig streitig machen. Es ist ferner nötig, darauf zu achten, daß die Temperatur der hypertonischen Lösung nicht zu hoch ist.[3] Für Strongylocentrotus purpuratus muß die Temperatur unter 20° liegen. Für andere Formen sind die absoluten Zahlen etwas verschieden, nicht nur für die Temperatur, sondern auch in bezug auf die Zeit, während welcher die Eier in der hypertonischen Lösung bleiben müssen.

## 2. Variationen dieser Methode.

Anstatt die Membranbildung beim unbefruchteten Seeigelei durch eine einbasische Fettsäure hervorzurufen, kann man sie mit irgend einem der bekannten cytolytischen Medien bewirken, z. B. durch Saponin. Löst man eine Spur Saponin in Seewasser auf und bringt man die Eier in dieses Seewasser, so bilden dieselben in wenigen Minuten eine prachtvolle Befruchtungsmembran. Sobald das geschieht, müssen die Eier sofort in normales Seewasser gebracht werden und durch vier- bis sechsmaliges Waschen in frischem Seewasser müssen sie sorgfältig von der letzten Spur des giftigen Saponins befreit werden. Dann behandelt man die Eier wie vorhin mit hypertonischem Seewasser. Bleiben sie zu lange in der Saponinlösung, so tritt Cytolyse der Eier ein. Auch bei ungenügendem Auswaschen der Eier nach der Membranbildung leiden sie.[4]

Auch artfremdes Blut kann zur Hervorrufung der Membranbildung beim Seeigelei verwendet werden, z. B. das Blut von Warmblütern oder von Gephyreen.[5] Die Membranbildung gelingt aber in diesem Falle nur

---

[1]) *Loeb*, Über den Unterschied zwischen isosmotischen und isotonischen Lösungen bei der künstlichen Parthenogenese. Biochem. Zeitschr. Bd. **11**. S. 144 (1908).

[2]) *Loeb*, Über den chemischen Charakter des Befruchtungsvorgangs. Biochem. Zeitschr. Bd. **1**. S. 183 (1906). Derselbe, Weitere Versuche über die Notwendigkeit von freiem Sauerstoff für die entwicklungserregende Wirkung hypertonischer Lösungen. *Pflügers* Archiv. Bd. **108**. S. 30. (1907).

[3]) *Loeb*, Untersuchungen über künstliche Parthenogenese. Leipzig 1906. S. 49.

[4]) *Loeb*, Über die Hervorrufung der Membranbildung und Entwicklung beim Seeigelei durch das Blutserum von Kaninchen und durch cytolytische Stoffe. *Pflügers* Archiv. Bd. **122**. S. 196 (1908).

[5]) *Loeb*, Weitere Versuche über die Entwicklungserregung des Seeigeleis durch das Blutserum von Säugetieren. *Pflügers* Archiv. Bd. **124**. S. 37 (1908).

bei den Eiern eines gewissen Prozentsatzes der Weibchen, während sie mit den anderen Mitteln bei den Eiern aller Weibchen gelingt.

3. Entwicklungserregung ohne Membranbildung.

Um die Eier ohne Membranbildung zur Entwicklung zu bringen, benutzt man die ursprüngliche Methode der künstlichen Parthenogenese, die darin besteht, daß man die Eier direkt in das hypertonische Seewasser bringt. Das hypertonische Seewasser kann in diesem Falle etwas konzentrierter sein als bei Eiern, die schon eine Membran besitzen. Man darf zu 50 *cm*³ Seewasser 8—16 *cm*³ einer 2½ n-NaCl-Lösung zusetzen. Man kann außerdem auch noch die Wirksamkeit der Lösung dadurch erhöhen, daß man dieselbe durch Zusatz von etwas Natronlauge etwas alkalischer macht (0·5—1·5 *cm*³ n/10-NaHO zu 50 *cm*³ Seewasser). Durch Zusatz der Lauge wird auch die Expositionsdauer etwas abgekürzt. Die Eier bleiben etwa 1—2 Stunden in der hypertonischen Lösung. Nach einer Stunde überträgt man in Intervallen von je 15 Minuten eine Portion der Eier in normales Seewasser.[1])

Die Ausbeute ist bei den Methoden mit Membranbildung viel günstiger als bei Methoden ohne Membranbildung, so daß die letzteren Methoden kaum mehr eine praktische Bedeutung besitzen. Bei den Methoden mit Membranbildung kann man bei vorsichtigem Arbeiten darauf rechnen, daß nahezu 100% der Eier sich zu Larven entwickeln, von denen ein großer Teil sich zu normalen Pluteen entwickelt.

4. Versuche am Seesternei.

Bei Versuchen mit Seesterneiern muß man berücksichtigen, daß die Eier bei der Herausnahme oft nicht reif sind. Man erkennt den Zustand der Unreife daran, daß der Kern in diesem Falle sehr groß und deutlich sichtbar ist. Da freier Sauerstoff für die Reifung nötig ist[2]), so lasse man die Eier in einer flachen Schale und in dünner Schicht, nur mit einer niedrigen Schicht Seewasser bedeckt liegen. Sind die Eier reif, d. h. haben dieselben eines oder beide Polkörperchen ausgestoßen, so sind dieselben für die künstliche Parthenogenese bereit. Die Methoden der Parthenogenese sind im Grunde dieselben wie beim Seeigelei, nur etwas einfacher, da das Seesternei schon eine Tendenz hat, sich ohne jeden äußeren Eingriff parthenogenetisch zu entwickeln. Die Vorsichtsmaßregeln bei der Herausnahme der Eier sind dieselben wie bei dem Seeigelei.

Bei Asterias in Woods Holle veranlaßten *Loeb* und *Neilson* die unbefruchteten Eier von Asterias Forbesii dadurch zur Entwicklung, daß sie dieselben 3—20 Minuten in Seewasser brachten, dem etwas Säure zugefügt war, etwa 3—5 *cm*³ n/10-Säure zu 100 *cm*³ Seewasser.[3]) *Delage* benutzt mit

---

[1]) *Loeb*, Zur Analyse der osmotischen Entwicklungserregung unbefruchteter Seeigeleier. *Pflügers* Archiv. Bd. **118**. S. 181 (1907).

[2]) *Loeb*, Über Eireifung, natürlichen Tod und Verlängerung des Lebens beim unbefruchteten Seesternei etc. *Pflügers* Archiv. Bd. **93**. S. 59 (1902). (Untersuchungen. S. 237.)

[3]) *Loeb* und *Neilson*, Weitere Versuche über künstliche Parthenogenese. *Pflügers* Archiv. Bd. **87**. S. 594 (1901). (Untersuchungen. S. 278).

Vorliebe Kohlensäure.[1]) Er läßt Kohlensäure durch das Seewasser gehen, ehe er die Eier in dasselbe bringt. Die Eier bleiben in dieser Lösung etwa eine Stunde. Diese Methode eignet sich aber nicht für quantitative Versuche.

Bei Asterina hat *Loeb* die künstliche Parthenogenese dadurch erzielt, daß er die Membranbildung bei den Eiern, nachdem sie gereift waren, durch Behandlung mit einer einbasischen Fettsäure hervorrief, ganz wie im Falle des Seeigeleis.[2]) Die Säuremengen, welche im Falle von Asterina zugefügt werden mußten, waren etwas höher als die Mengen, welche für das Ei von Strongylocentrotus nötig waren.

5. Künstliche Parthenogenese am Molluskenei.[3])

Bei Versuchen an den Eiern von Lottia gigantea und verschiedenen Arten von Acmaea hat sich die ursprüngliche Methode der künstlichen Parthenogenese mittelst hypertonischen Seewassers bewährt. Man bringt die Eier in eine Mischung von 50 $cm^3$ Seewasser und 8—16 $cm^3$ $2^1/_2$ n-NaCl-Lösung. Die Eier bleiben hier 1—2 Stunden. Nach einer Stunde fängt man an in Intervallen von je 15 Minuten eine Portion der Eier in normales Seewasser zu übertragen.

Die Resultate werden erheblich besser, wenn man zu je 50 $cm^3$ der hypertonischen Lösung 0·5—1·0 $cm^3$ n/10-NaHO zusetzt.

6. Künstliche Parthenogenese am Annelidenei.

Bei den unbefruchteten Eiern von Chaetopterus kann man die Entwicklung dadurch veranlassen, daß man dieselben 10—30 Minuten in Seewasser bringt, dessen Kaliumgehalt genügend erhöht ist. Eine Mischung von 95 $cm^3$ Seewasser und 5 $cm^3$ $2^1/_2$ n-KCl-Lösung genügt dieser Bedingung.[4])

Bei Amphitrite gelang die Entwicklungserregung durch Hinzufügen einer entsprechenden Quantität eines Calciumsalzes.[5]) In beiden Fällen erhielt man eine Larvenentwicklung ohne Zellteilung. Die Larven starben nach kurzer Zeit.

Bessere Resultate wurden erzielt bei zwei anderen Annelidenformen, nämlich Thalassema und Polynose. Bei Thalassema gelang es *Lefevre*[6]), eine normale Entwicklung dadurch zu erzielen, daß er die Eier 5 Minuten in eine Mischung von 15 $cm^3$ einer n/10-Säure, z. B. Salzsäure oder Essigsäure, und 85 $cm^3$ Seewasser brachte. Nach der Übertragung der Eier in normales Seewasser gaben sie die Polkörperchen ab und entwickelten sich zu normalen Larven unter Furchung. Bei Polynose gelang dasselbe dadurch, daß die Eier erst zwei Stunden in hyperalkalisches Seewasser (1·5 $cm^3$ n/10-

---

[1]) *Delage*, Nouvelles recherches sur la Parthénogénèse expérimentale chez Asterias glacialis. Arch. de Zoolog. expérimentals. 3e série. T. **10**. p. 213 (1902).

[2]) *Loeb*, Untersuchungen über künstliche Parthenogenese. Leipzig 1906. S. 349.

[3]) *Loeb*, Über die allgemeinen Methoden der künstlichen Parthenogenese. *Pflügers* Archiv. Bd. **118**. S. 575 (1907).

[4]) *Loeb*, Untersuchungen über künstliche Parthenogenese. Leipzig 1906. S. 167.

[5]) *Loeb* und *Fischer*, ibid. S. 280.

[6]) *Lefevre*, Artificial Parthenogenesis in Thalassema mellita. Journal of Experimental Zoology. Vol. 4. p. 92 (1907).

NaHO zu 50 *cm*³ Seewasser) und dann 2 Stunden in hypertonisches Seewasser (50 *cm*³ Seewasser + 10 *cm*³ $2^1/_2$ n-NaCl) übertragen wurden.[1])

Die Behandlung der Eier mit Alkali läßt sich ersetzen durch eine Behandlung derselben mit Seewasser, dem eine Spur Saponin zugefügt ist. Man läßt die Eier etwa $1^1/_2$ Minuten in dieser Lösung, bis sie anfangen eine Membran zu bilden[2]), und überträgt sie dann nach wiederholtem gründlichem Waschen in normalem Seewasser für etwa 2 Stunden in hypertonisches Seewasser. In normales Seewasser zurückgebracht, entwickeln sie sich.

Bei der Anwendung der hypertonischen Lösungen muß man berücksichtigen, daß der Temperaturkoeffizient für die Wirksamkeit desselben relativ hoch ist (etwa 3—5 für 10° [3]).

Bei Versuchen über künstliche Parthenogenese bei Echinus esculentus in Plymouth, England, habe ich neuerdings gefunden, daß es zur Erzielung einer guten Membranbildung nötig ist, die Eier aus dem buttersäurehaltigen Seewasser in eine Mischung von 50 *cm*³ + 1·0 $^n/_{10}$ NaHO zu bringen. Nach der Membranbildung überträgt man sie wieder ins Seewasser.[4])

[1]) *Loeb,* Über die allgemeinen Methoden der künstlichen Parthenogenese. *Pflügers* Archiv. Bd. **118**. S. 572 (1907).

[2]) Über die Entwicklungserregung unbefruchteter Annelideneier mittelst Saponin und Solanin. *Pflügers* Archiv. Bd. **122**. S. 448 (1908).

[3]) *Loeb,* Untersuchungen. S. 494.

[4]) Einee ingehende Diskussion der Methode der künstlichen Parthenogenese findet der Leser in meinem neuen Buche: Die chemische Entwicklungserregung des tierischen Eies. 1909.

# Die wichtigsten Methoden der Immunitätsforschung.

Von **Leonor Michaelis**, Berlin.

## Herstellung und Nachweis von Antikörpern.

Von den spezifischen Antikörpern kommen für die physiologische Chemie hauptsächlich die Eiweißpräzipitine, die Hämagglutinine und die Hämolysine in Betracht. Hiervon sollen an der Hand eines konkreten Beispieles erstens die Präzipitine, zweitens die Hämagglutinine und Hämolysine und drittens das durch Kombination dieser beiden Gebiete hervorgehende Verfahren der Komplementablenkung geschildert werden.

## I. Die Eiweißpräzipitine.

Wir stellen uns die Aufgabe, ein Präzipitin für Pferdeserumeiweiß herzustellen und seine Wirksamkeit zu erkennen. Dazu injizieren wir einem Versuchstiere einige Male Pferdeserum, entnehmen dem Versuchstiere Blut und zeigen, daß das daraus gewonnene Serum im Reagenzglas mit Pferdeserum einen Niederschlag gibt.

### 1. Die Wahl des Versuchstieres.

Wenn nicht ganz besondere Gründe es verbieten, wähle man als Versuchstier das Kaninchen; kommt es auf die Gewinnung besonders großer Serummengen an, so wähle man zwischen Hammel, Ziege oder Pferd. In unserem Falle ist das Pferd eo ipso ausgeschlossen, weil Pferdeserum, einem Pferde injiziert, kein Präzipitin erzeugt; stets muß die injizierte Eiweißart einer dem injizierten Tiere fremden Spezies entstammen. Von den kleineren Versuchstieren ist das Kaninchen besonders geeignet, weil es leicht Antikörper erzeugt und die besondere Ausbildung seiner Ohrvene intravenöse Injektionen und häufige Probeblutentnahmen ohne operative Eingriffe erleichtert. Niemals wähle man Hund oder Katze als Versuchstier, weil diese keine Präzipitine erzeugen.

### 2. Die Methodik der Injektionen.

Man kann zwischen der subkutanen, intraperitonealen oder intravenösen Injektion wählen. Die subkutane Injektion macht man am besten unter die Rückenhaut. Zur intraperitonealen Injektion lasse man das Kaninchen, an der Nackenhaut und den Hinterfüßen gefaßt, die Bauchseite nach oben, das Kopfende etwas gesenkt, halten, entferne an einer kleinen Stelle etwa in der Mitte des Bauches einige Haare, am besten durch einmaliges Ausrupfen, säubere diese Stelle mit Alkohol und steche mit der Spritze dreist senkrecht hinein, indem man sofort mit der Injektion beginnt, um dadurch die der Kanülenspitze sich anlegenden Därme von sich zu drängen.

Die intravenöse Injektion führt man beim Kaninchen in folgender Weise aus: Ein Gehilfe hält sitzend das Tier fest und hält ein Ohr des



Fig. 347.

Tieres (Fig. 347) dem Operateur entgegen. Man führe nun die Kanüle der vollständig gefüllten, von Luft befreiten Spritze in tangentialer Richtung etwa $^1/_2$—1 *cm* weit in die Vene des lateralen Ohrrandes ein und führe die Injektion langsam aus. Man muß das Durchströmen der Vene beobachten können und sich überzeugen, daß kein subkutanes Ödem entsteht. Sollten die Venen sehr eng sein, so kann man sie dadurch erweitern, daß man das Ohr mit einem mit Xylol befeuchteten Tuch leicht einreibt. Nach Beendigung der Injektion ziehe man die Spritze heraus und komprimiere sofort die Injektionsstelle eine Minute zwischen den Fingern

Im allgemeinen ist die intraperitoneale Injektion die bequemste. Man injiziere bei jeder Injektion 5—10 $cm^3$ Serum, bei intravenöser Injektion 1—2 $cm^3$.

### 3. Die Injektionsintervalle.

Nach der ersten Injektion warte man mindestens 6—7 Tage, nicht weniger, vor allem aber auch nicht mehr (wegen der Gefahr der

dann eintretenden Überempfindlichkeit), bis man die zweite macht. 6 bis 7 Tage nach der zweiten Injektion kann man schon eine Probeblutentnahme vornehmen, meist ist aber noch eine dritte Injektion nötig. Manche Tiere steigern den Präzipitingehalt durch weitere, in Intervallen von 5 bis 6 Tagen fortgesetzte Injektionen noch weiter. Auf jeden Fall warte man mit der Blutentnahme mindestens 5—6 Tage nach der letzten Injektion.

Wenn nach Monaten der Präzipitingehalt des Kaninchenblutes schon stark abgenommen hat, so läßt er sich meist durch eine einmalige Injektion wieder in die Höhe treiben.

Die Dosen für die einzelnen Injektionen kann man stets gleich wählen. Man hüte sich, mit der Zahl der Injektionen die Dosis zu verstärken, wie man es zur Herstellung von Antitoxinen macht, die oft eintretende Überempfindlichkeit nach wiederholten Injektionen macht eine Steigerung der Dosis ganz besonders bei intravenöser Injektion gefährlich, besonders wenn man das Intervall zwischen den Injektionen größer als hier angegeben nimmt. Manche Tiere, die bei der ersten Injektion jede beliebige Menge Serum vertragen, werden bei einer wiederholten Injektion von 2 *cm*³ in die Vene getötet. Man gebe bei der ersten Injektion eine reichliche Dosis (5—10 *cm*³), da gerade geringe Dosen (Zentigramme oder Milligramme Serum) bei der ersten Injektion die Überempfindlichkeit für die zweite begünstigen.

### 4. Gewinnung des Präzipitinserums.

Braucht man kleinere Mengen Serum, so macht man eine Probeblutentnahme, für größere Mengen eine totale Entblutung.

1. Die Probeblutentnahme beim Kaninchen wird in folgender Weise ausgeführt: Wenn nötig, befreie man etwa eine 1 *cm* lange Stelle der lateralen Ohrvene durch Rupfen von den Härchen. Dann reibe man das Ohr mit einem mit Xylol befeuchteten Lappen etwas ein und trockne es wieder. Nach einer Minute sind die Venen prall gefüllt. Dann mache man mit einer kleinen Lanzette, wie sie etwa in mikroskopischen Präparierbestecken sind, einen feinen Schlitz in die Vene. Dann tropft das Blut manchmal sofort, manchmal nach einiger Zeit in dicken Tropfen herab. Wenn es nach einer Weile zu versiegen beginnt, so reibe man die Thromben an der Venenöffnung fort; sodann beginnt die Blutung meist von neuem. Um die Blutung zu sistieren, warte man entweder einen Zeitpunkt ab, wo dies von selbst eintritt. Geschieht dies nicht, so komprimiere man die Vene. Entweder legt man an den Rand des Ohres eine kleine, nicht zu stark klemmende Arterienklemme für 10 Minuten an oder man streift einen Gummiring über das ganze Ohr hinweg bis auf die Ohrwurzel. Diesen Gummiring improvisiert man sich, indem man ein 3 *mm* langes Stück eines Gummischlauches (Leuchtgasschlauches) abschneidet. Man benutzt ihn je nach Bedarf einfach oder zusammengefaltet. Sobald wie möglich, spätestens nach einer Stunde, entferne man die Ligatur, weil sonst Gangrän des Ohres eintreten kann.

Meist gelingt es leicht, 20—30 *cm*³ Blut so zu erhalten. Die angeschnittene Stelle des Ohres verheilt manchmal spurlos, in anderen Fällen obliteriert sie. Will man einem Tiere häufig Probeblutentnahmen machen, so mache man die erste, um die Venen gut auszunutzen, möglichst peripher und die folgenden immer weiter zentralwärts.

2. Die totale Entblutung. Das Tier wird mit dem Rücken auf ein Operationsbrett aufgespannt, der Hals möglichst gestreckt. Die Halsgegend wird rasiert und etwas seitlich von der Mittellinie ein etwa 6 *cm* langer Schnitt gemacht, dann präpariert man möglichst stumpf die Karotis heraus, welche man in der Tiefe des Winkels zwischen Musculus sternocleidomastoideus und Musculus omohyoideus findet. Man unterminiere sie auf eine Strecke von mindestens 4 *cm*, trenne sie vom Nervus vagus los und unterbinde sie zunächst so peripher wie möglich. Dann lege man möglichst zentral eine Arterienklemme an und spieße an einer bequem liegenden Stelle mit einer sehr scharfen, mit langem Griff versehenen Präpariernadel die Wand der Arterie auf in der Art, daß die Nadel nicht durch das Lumen der Arterie geht. Die Nadel soll ein sicherer Zügel für die Arterie sein. Hat man das erreicht, so schneide man die Arterie durch und lüfte die Klemme. Mit der Nadel dirigiert man den Blutstrahl in die gewünschte Richtung.

Die Ausbeute bei einem nicht zu kleinen Kaninchen ist selten unter 80 *cm*³, manchmal erheblich mehr.

## Gewinnung des Serums.

Das Serum kann aus dem Blute durch spontane Ausscheidung oder durch Zentrifugieren gewonnen werden. Zum Zwecke der spontanen Abscheidung fange man das Blut in einem zylinderförmigen Gefäß auf, lasse es in etwa schräger Lage gerinnen, löse den Blutkuchen nach Beendigung der Gerinnung mit einem scharfen Instrument, einem langen schmalen Messer oder mit einem festen Draht ringsherum von der Glaswand ab und lasse es einen Tag im Eisschrank stehen. Dann scheidet sich das Serum ab, nach weiteren 24 Stunden oft noch ein beträchtlicher zweiter Anteil. Man hebe das Serum mit einer Pipette ab. Nötigenfalls kann man es dann noch zentrifugieren.

Die Gewinnung des Serums durch sofortiges Zentrifugieren geschieht in folgender Weise: man fange das Blut gleich in dem Zentrifugiergefäße auf, lasse es zunächst vollkommen gerinnen, und erst, wenn dies sicher eingetreten ist, löse man die geronnene Blutmasse von der Wand des Glases ab und zentrifugiere dann sofort mit einer Tourenzahl von 2000 bis 3000 pro Minute, etwa 1/4 Stunde lang. Dann pipettiere man das Serum ab. Dies geschieht am besten mit einer mit Gummihütchen versehenen, fein ausgezogenen Glaspipette.

## Die Aufbewahrung des Serums.

Die beste Aufbewahrung ist die in sterilem Zustand ohne jeden Zusatz. Bei größeren Serummengen kann man durch Filtrieren durch Ton-

kerzen sichere Sterilität erreichen. Am besten dürfte sich dazu der Apparat von *Uhlenhut* und *Weidanz*[1]) eignen. Für physiologische Zwecke wird man kaum in die Lage kommen, ihn zu benutzen.

Bei Antikörpern, welche höhere Temperaturen gut vertragen, wie die Präzipitine, kann man aber auch einfach vollkommene Sterilität dadurch erreichen, daß man das Serum, sauber entnommen, in sterilisierte Reagenzgläser abfüllt, diese zuschmilzt und an drei aufeinanderfolgenden Tagen $^1/_4$ Stunde lang in ein Wasserbad von 52—55° bringt. Die Aufbewahrung geschieht dann im Eisschrank. Angebrochene Quanten werden am besten durch Einfrieren konserviert.

Den Gefrierkasten läßt man sich am besten gleich so einrichten, daß die Materialien in Reagenzgläsern (aus besonders dickem, nicht so leicht zerbrechlichem Glase angefertigt) eingefüllt, bequem untergebracht werden können. Ein mit einem starken Luftmantel versehener Holzkasten mit Bleibelegung (andere Metalle sind unbrauchbar) wird täglich einmal mit einem Gemisch von Viehsalz und nicht zu fein zerhacktem Eis gefüllt. In das Eis wird ein Gestell für Reagenzgläser (ebenfalls aus Blei) vermittelst eines keilartig geformten Bodens durch schraubenartige Bewegungen hineingedrückt.[2])

Sehr empfehlenswert ist auch die Aufbewahrung der im Vakuum über Schwefelsäure bei etwa höchstens 40° völlig getrockneten Sera. Diese Methode ist besonders für den Versand und für sehr lange Aufbewahrung zu empfehlen. Die getrockneten Sera werden in Reagenzgläser eingeschmolzen und vor dem Gebrauch in Wasser gelöst. Gerade für die Präzipitine ist diese sonst sehr empfehlenswerte Methode nicht die ideale, weil die Wiederlösung der Trockensera in wenig verdünntem Zustand oft sehr opaleszente Lösungen gibt. Dagegen ist es für jahrelange Konservierung z. B. der hämolytischen Sera die ideale Methode.

Auch Desinfektionsmittel kann man zur Aufbewahrung anwenden: Chloroform, wenige Tropfen auf ein Reagenzglas, Karbolsäure, $^1/_{10}$ Volumen einer 5%igen Lösung. Toluol ist nicht sehr geeignet, weil es leicht Trübungen erzeugt.

Für die Aufbewahrung der zu injizierenden Sera oder Eiweißlösungen gilt dasselbe. Hier dürfte die Aufbewahrung unter Chloroform die bequemste sein. Man fülle das Serum in einen Kolben, gebe auf je 100 $cm^3$ nicht mehr als 1 $cm^3$ Chloroform zu, schüttele durch und verschließe den Kolben gut (nicht mit einem Wattepfropf!).

## 5. Die Prüfung des Präzipitins.

Man halte sich kleine Reagenzgläser vorrätig, etwa 8 *mm* breit und 8 *cm* lang, mit einem passenden Gestell, ferner Pipetten zu 1 $cm^3$ in [illegible]

[1]) Siehe *Weidanz* in Handbuch der Methodik der Immunitätsforschung von *Kraus* und *Levaditi*.

[2]) Ein passendes Gestell nebst Gefrierapparat habe ich in den Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Berlin N., anfertigen lassen. Viel in Gebrauch ist auch der Gefrierapparat „Frigo" von Lautenschläger in Berlin.

geteilt, auf Ausblasen geaicht. Man fülle in eine Reihe von Reagenzgläsern je 0·5 $cm^3$ Pferdeserum ein, und zwar unverdünnt, $^1/_2$ verdünnt, $^1/_4$ verdünnt usw. Man macht das am besten in folgender Weise. Man fügt aus einer größeren, 10 $cm^3$ fassenden Pipette in alle Reagenzgläser mit Ausnahme der ersten 0·5 $cm^3$ einer 0·85%igen ClNa-Lösung. Dann nimmt man 1 $cm^3$ Pferdeserum in eine 1 $cm^3$ fassende Pipette, läßt davon $^1/_2$ $cm^3$ in das erste Glas, $^1/_2$ $cm^3$ in das zweite. Man mischt das zweite durch wiederholtes Auf- und Abziehen der Flüssigkeit gut durch und entnimmt dann mit derselben Pipette $^1/_2$ $cm^3$ und bringt sie in das dritte Glas; hier mischt man mit derselben Pipette ebenso und verfährt so weiter.

Will man größere Abstände zwischen den Gläsern machen, so mache man in entsprechender Weise die Verdünnungen 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 usw. bis 1 : 1,000.000. In allen Röhrchen muß das Volumen zum Schluß gleich sein. Sodann gibt man mit einer neuen Pipette in jedes der Röhrchen 0·2 $cm^3$ des Präzipitinserums hinzu und wartet ab. Erwärmung im Brutschrank beschleunigt die Reaktion. Es entsteht dann eine Trübung, die sich im Laufe von einer Stunde oder später zu einem Niederschlag zusammenballt. Wenn man nach 1stündigem Aufenthalt im Brutschrank die Röhrchen ins Zimmer stellt, so tritt bei der Abkühlung die Präzipitation oft plötzlich ein. Der Niederschlag ist nicht am stärksten da, wo am meisten Pferdeserum zugegeben ist, sondern in einer der mittleren Verdünnungen, weil ein Überschuß der präzipitablen Substanz die Niederschlagsbildung hemmt.

Mitunter sind die präzipitablen Substanzen so trübe, daß man direkt die Präzipitinreaktion nicht vornehmen kann, welche natürlich völlige Klarheit der Reagenzien verlangt. Man habe z. B. die Aufgabe, in einem Extrakt aus einem Organ oder einer Wurst Pferdeserumeiweiß nachzuweisen. Es sind für die polizeiliche und forensische Anwendung für diesen Zweck verschiedene Verfahren angegeben worden, ich glaube aber, daß man für physiologische Zwecke mit folgender Methode immer auskommen wird. Das Organ (oder die Wurst) wird zuerst grob zerschnitten, dann im Mörser zerkleinert, so wie es ohne Anwendung besonderer Mittel möglich ist, dann einige Stunden im Schüttelapparat extrahiert mit der 10fachen Menge einer wässerigen Lösung von 1% ClNa und 0·5% Phenol. Dann lasse man das Gemisch einen Tag auf Eis stehen. Darauf läßt es sich durch wiederholtes Aufgießen auf ein und dasselbe Filter gewöhnlich leicht in genügender Menge klar filtrieren. Man prüfe das Filtrat darauf, ob es überhaupt Eiweiß gelöst enthält. Bei einem Gehalt von weniger als 1‰ an Eiweiß ist es für die Präzipitinreaktion schon gut brauchbar. Man nehme dann ebenso wie oben etwa 0·5 $cm^3$ des Extraktes und 0·2 $cm^3$ des Präzipitins. Ist der Extrakt sehr reich an Eiweiß, so tut man gut, ebenso wie oben, die Probe mit abfallenden Verdünnungen anzustellen, weil möglicherweise die unverdünnte Lösung soviel Eiweiß enthalten könnte, daß die optimale Reaktion schon überschritten ist. Fremdes, mit dem Präzipitin nicht reagierendes Eiweiß hemmt selbst im Überschuß die eigentliche Präzipitinreaktion nicht oder kaum.

Eine Wertmessung des Präzipitinserums ist für physiologische Zwecke kaum nötig. Man wird vielmehr im Einzelfalle durch die leicht zu konstruierenden Kontrollversuche zu beweisen haben, daß das Präzipitin in der angewandten Dosis das gewünschte Eiweiß in der etwa zu erwartenden Konzentration sicher anzeigt, und daß es mit jeder anderen in Betracht kommenden Eiweißart in allen Mengenverhältnissen negativ reagiert. Auch kann man, wo es sich um physiologische Zwecke handelt, nicht einen besonders hohen Titer des Serums zur Grundbedingung machen. Es ist nur nötig, daß unter den gewählten Bedingungen das Serum von Fall zu Fall sich als eindeutiges Reagens auf die gewünschte Eiweißart erweist.

### Quantitative Eiweißbestimmungen mit der Präzipitinmethode.

Eine angenäherte quantitative Bestimmung von Eiweiß mit der Präzipitinmethode gestaltet sich folgendermaßen. Man habe z. B. die Aufgabe die Menge des Pferdeserums zu bestimmen, welche sich in einem Kaninchenserum befindet, etwa wenn das Serum von einem Kaninchen stammt, welchem kurze Zeit vor der Blutentnahme Pferdeserum injiziert worden ist.

Man füge zu einer Reihe von kleinen Reagenzgläsern, die alle mit der gleichen Menge Präzipitin, z. B. 0·2 *cm*³, beschickt sind, das zu untersuchende Serum in wechselnden Verdünnungen, stets in dem gleichen Volumen von z. B. 0·5 *cm*³, also

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Präzipitin . . . . . . . | 0·2 | 0·2 | 0·2 | 0·2 | 0·2 |
| zu untersuchendes Serum | (1/1) 0·5 | (1/2) 0·5 | (1/4) 0·5 | (1/8) 0·5 | (1/16) 0·5[1] usw. |

Man finde etwa, daß Nr. 4 gerade noch eine nach 1 Stunde nachweisbare Trübung gibt, nicht aber mehr Nr. 5. Dann probiere man auf ähnliche Weise eine Verdünnung von reinem Pferdeserum aus, die in der Menge von 0·5 *cm*³ gerade noch nach einer Stunde eine Trübung mit 0·2 Präzipitin gibt. Diese Verdünnung enthält dann annähernd ebensoviel Pferdeserum wie die oben ermittelte Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit. Daraus läßt sich der Gehalt an Pferdeserum leicht berechnen. Die Methode reicht für physiologische Zwecke aus.

Genauer ist die Methode der Komplementablenkung.

## II. Die Hämolysine.

Es sei die Aufgabe gestellt, ein Hämolysin für Hammelblut zu erzeugen. Als Versuchstier wählen wir wieder das Kaninchen. Man stelle sich zunächst eine geeignete Aufschwemmung von Blutkörperchen her. Das Blut als solches zu injizieren, ist nicht ratsam, weil es Entstehung der Eiweißpräzipitine für das mitinjizierte Serum hervorrufen kann und diese unter Umständen unerwünscht ist. Man besorgt sich zunächst eine Portion frisches Hammelblut. Man umschnürt den Hammel am Halse nicht zu

---

[1]) d. h. von einer Verdünnung im Verhältnis von 1 mit 15 (0·5 *cm*³).

fest mit einem Gummischlauch, so daß die Vena jugularis deutlich anschwillt. Dann sticht man mit einem Troikart von der angegebenen Form (Fig. 348) tangential in die Vena jugularis ein und fängt das Blut in einem sterilen, mit Glasperlen beschickten Kolben auf, schüttelt sofort einige Minuten, bis die Defibrinierung als beendet gelten kann. Die Blutung steht sofort nach Abnahme des Schlauches, schlimmsten Falles nach einiger Kompression mit dem Finger. Man kann einem Hammel auf diese Weise alle paar Tage 50—150 $cm^3$, bei seltenerer Entnahme weit mehr Blut entnehmen. Auch aus dem Ohr erhält man mittlere Blutmengen. Man schneide mit der Schere in den Rand des Ohres ein wenig ein, worauf das Blut gewöhnlich bald zu tropfen beginnt. Auch das beim Schlachten der Tiere aufgefangene, sofort defibrinierte Blut ist gut brauchbar.

Das geschlagene Blut wird nun genau abgemessen und mit beliebiger (etwa der 10fachen) Menge 0·85%iger ClNa verdünnt, sofort mit einer guten Zentrifuge von 2000—3000 Touren pro Minute zentrifugiert, bis die Blutkörperchen ganz zusammengeballt am Boden des Glases liegen, dann wird die klare Flüssigkeit mit einer Pipette[1]) mit Gummihütchen immer unter Kontrolle des Auges abgehoben, dann frische ClNa-Lösung eingefüllt, mit einem Glasstab gut umgerührt, wieder zentrifugiert usw. Gewöhnlich genügt ein 3maliges Waschen für diesen Zweck. Zum Schlusse fülle man die Blutkörperchen mit der ClNa-Lösung auf das 20fache desjenigen Volumens auf, welches das Gesamtblut zu Anfang eingenommen hatte. Von dieser Aufschwemmung injiziert man in denselben Intervallen, wie bei den Präzipitinen beschrieben, 10 $cm^3$ intraperitoneal oder 2 $cm^3$ in die Ohrvene. Über die Zahl der Injektionen gilt dasselbe wie bei den Präzipitinen; meist genügen zwei Injektionen zur Erzielung eines kräftigen Hämolysins, über die Zeit der Blutentnahme gilt dasselbe wie bei den Präzipitinen.



Fig. 348.

Das von dem Kaninchen gewonnene Serum wird zunächst „inaktiviert", indem es 30 Minuten in ein Wasserbad von 55° gebracht wird. Man füllt das Serum dazu in Reagenzgläser ab und bringt in jedes Glas nur soviel Serum, daß dieses ganz in das Wasserbad eintaucht. Die Regulation der Temperatur kann man für die kurze Zeit ganz gut aus freier Hand vornehmen, man kann auch an ein kleines Wasserbad einen Quecksilberregulator anbringen lassen. Die Inaktivierung in einem Luftbade ist auf jeden Fall ein Fehler, weil es unberechenbar lange Zeit dauert, bis die Gläser die Temperatur der Luft angenommen haben.

Ferner muß man sich jetzt Komplement herstellen, und zwar in Form von frischem Meerschweinchenserum. Am schnellsten, wenn auch vielleicht nicht mit maximaler Ausbeute, geschieht das in folgender Weise:

[1]) Über eine automatische Serienpipette s. S. 1200, Fußnote.

Ein Meerschweinchen wird durch einen langen Schnitt mit dem Rasiermesser am Halse getötet und das herausspritzende Blut durch einen größeren Trichter in ein Zentrifugiergefäß aufgefangen. Nachdem das Blut vollkommen geronnen ist, wird es, wie oben beschrieben, von der Wand des Glases abgelöst und stark zentrifugiert. Nach einer Viertelstunde kann man das klare Serum mit einer Pipette mit Gummihütchen unter Kontrolle des Auges absaugen. Von einem mittleren Meerschweinchen gewinnt man etwa 6--10 $cm^3$ Serum.

Der Komplementgehalt des frischen Serums nimmt bei Zimmertemperatur schon in einem Tage stark ab, weniger im gut gekühlten Eisschrank. Verläßlich konstant bleibt der Komplementgehalt für mehrere Tage nur beim Einfrieren.

Zur Prüfung des Hämolysins stelle man sich die oben beschriebene 5%ige Blutkörperchenaufschwemmung her.

## Der Nachweis des Hämolysins.

Man fülle in gewöhnliche große Reagenzgläser je 1 $cm^3$ der 5%igen Blutaufschwemmung und je 1 $cm^3$ des zehnfach verdünnten Komplementes, ferner je 1 $cm^3$ verschiedener Verdünnungen des inaktivierten Hämolysins (des „Ambozeptor" oder „Sensibisator"). Als geeignete Verdünnungen nehme man z. B. $^1/_{10}$, $^1/_{30}$, $^1/_{100}$, $^1/_{300}$, $^1/_{1000}$. 1 $cm^3$ hiervon entspricht also 0·1, 0·03, 0·01, 0·003, 0·001 $cm^3$ Serum.

Nach guter Durchmischung werden die Röhrchen in ein Wasserbad oder in den Brutschrank von 37° gebracht, nach zwei Stunden nehme man sie heraus und bewahre sie im Eisschrank bis zum nächsten Tag auf. In den ersten Röhrchen wird die Hämolyse schon nach einigen Minuten bis nach 2 Stunden komplett sein, d. h. die Flüssigkeit ist lackfarben ohne jedes Sediment, in den mittleren Röhrchen ist die Flüssigkeit weniger gerötet und die Kuppe des Reagenzglases ist am nächsten Tage von einem Sediment roter Blutkörperchen bedeckt. In den letzten Röhrchen ist die Flüssigkeit farblos und die Blutkörperchen liegen intakt auf dem Boden des Glases. Wenn man auf die Beobachtung des Sediments verzichten will, kann man das gleiche Resultat sofort nach 2stündigem Aufenthalt im Brutschrank bekommen; die undurchsichtige Blutkörperchenaufschwemmung wird lackfarben. Unter der einfach löslichen Dosis des Ambozeptors versteht man diejenige Menge, welche bei dieser Versuchsanordnung gerade eben vollkommene Hämolyse hervorruft. Nach obigem Vorversuch muß sie durch eingeschaltete Zwischenglieder näher präzisiert werden. Ein guter Ambozeptor kann nicht selten eine lösende Dosis von weit weniger als 0·001 $cm^3$ haben.

Die hiermit bestimmte lösende Dosis bezieht sich auf die gleichzeitige Wirkung von 0·1 $cm^3$ Komplement. Im allgemeinen gilt aber die Regel: je mehr Komplement, um so kleiner ist die lösende Dosis des Ambozeptors, je mehr Ambozeptor, um so kleiner ist die lösende Dosis des Komplements. Es besteht aber keine Proportionalität in dieser Beziehung.

### Der Nachweis der Hämagglutinine.

Viele Sera, die hämolytisch wirken, agglutinieren die Blutkörperchen gleichzeitig. So entsteht z. B., wenn man einem Kaninchen Mäuseblut injiziert, neben dem Hämolysin gleichzeitig ein kräftiges Agglutinin; bei Hammelblut ist von Agglutininwirkung neben dem Hämolysin kaum etwas zu bemerken. Ist Komplement zugegen, so tritt, wenn die Hämolyse sehr rasch verläuft, die Agglutination nicht in Erscheinung. Bei langsamerem Verlauf pflegt die Agglutination der Lösung voraufzugehen. Um die Agglutination rein zu studieren, muß man bei Abwesenheit von Komplement arbeiten.

In der äußeren Erscheinung nicht verschieden von dieser spezifischen Agglutination ist die Agglutination durch Ricin und verwandte Phytotoxine sowie die Agglutination durch Schwermetallsalze oder durch isotonische Zuckerlösung. Zum Nachweis der Agglutination verwendet man in der Regel dieselbe 5%ige Blutkörperchenaufschwemmung wie früher. Während unter gewöhnlichen Bedingungen die Blutkörperchen sich sehr langsam auf den Boden des Glases absetzen, fallen agglutinierte Blutkörperchen rascher, oft in wenigen Minuten, zu Boden und bilden verklumpte Haufen, die nach dem gewaltsamen Aufschütteln die Neigung haben, wieder zusammenzuflocken. Die Agglutination ist vollständig, wenn alle Blutkörperchen verklebt sind. Bei Agglutininmengen, die unter der vollständig agglutinierenden Dosis liegen, beteiligen sich nicht alle Blutkörperchen an der Agglutination, sondern über den agglutinierten, gut sedimentierten Blutkörperchen steht noch eine Schicht von nicht oder schlecht sedimentierten Blutkörperchen.

## III. Die Methode der Komplementablenkung.

Wenn Präzipitin und Präzipitogen zusammentreffen, so entsteht ein Niederschlag. Gleichzeitig tritt eine zweite Reaktion ein: ein etwa in der Lösung befindliches Komplement wird in irreversibler Weise gebunden. Diese zweite Reaktion, von *Bordet* und *Gengou*[1]) sowie später von *Moreschi*[2]) gefunden, kann an Stelle der Präzipitinreaktion zum Nachweis von Antikörpern benutzt werden. Sie hat den Vorzug, daß sie bei richtiger Ausführung von einer unerhörten Empfindlichkeit trotz völliger Eindeutigkeit ist und auch da anzuwenden ist, wo eine sichtbare Niederschlagsbildung nicht mehr eintritt.

Hat man die Aufgabe, ein bestimmtes Präzipitogen nachzuweisen, so verfährt man im Prinzip folgendermaßen:

1. Die auf Präzipitogen zu untersuchende Flüssigkeit wird mit dem Präzipitin vermischt;

[1]) *O. Gengou,* Sur les sensibilatrices des sérums actifs contre les substances albuminoïdes. Ann. *Pasteur.* T. **16** (1902).

[2]) *C. Moreschi,* Zur Lehre von den Antikomplementen. Berl. Klin. Wochenschr. Jg. **1905**. S. 118.

2. es wird Komplement in Form von frischem Meerschweinchenserum zugefügt. Jetzt wird weiter untersucht, ob dieses Komplement unverändert bleibt oder ob es nach 1 Stunde aus der Lösung verschwunden ist. Als Reagens auf das Komplement fügt man deshalb nach 1 Stunde hinzu

3. gewaschene Hammelblutkörperchen und gleichzeitig

4. einen durch Injektion von Hammelblutkörperchen vom Kaninchen vorher präparierten, inaktivierten Ambozeptor.

Wird das Hammelblut jetzt gelöst, so war das Komplement frei, d. h. die zu untersuchende Flüssigkeit enthielt das gesuchte Präzipitogen nicht. Bleiben die Hammelblutkörperchen ungelöst, so zeigt das an, daß die zu untersuchende Flüssigkeit das gesuchte Antigen enthielt.

Zur Ausführung der Methode bedarf es folgender Flüssigkeiten: Es sei z. B. die Aufgabe gestellt, in einer

Flüssigkeit *A* Pferdeserumeiweiß nachzuweisen. Dann braucht man dazu

*B* ein in der früher beschriebenen Weise hergestelltes Präzipitin für Pferdeserum, gewonnen vom Kaninchen;

*C* Komplement in Gestalt von ganz frischem Meerschweinchenserum;

*D* einen vom Kaninchen gewonnenen, inaktivierten hämolytischen Ambozeptor für Hammelblutkörperchen, dessen einfach lösende Dosis in der vorher definierten Weise genau bestimmt worden ist;

*E* eine 5%ige Aufschwemmung von Hammelblutkörperchen.

Zur Ausführung der Reaktion nimmt man am besten die gewöhnliche große Form der Reagenzgläser. Man setze z. B. folgenden Versuch an:

| | | Röhrchen 1 | Röhrchen 2 | Röhrchen 3 | Röhrchen 4 |
|---|---|---|---|---|---|
| Flüssigkeit | *A* | 0·1 *cm*³ | 0·01 *cm*³ | 0·001 *cm*³ | 0·0001 *cm*³ |
| Präzipitin | *B* | 0·1 „ | 0·1 „ | 0·1 „ | 0·1 „ |
| Komplement | *C* | 0·05 „ | 0·05 „ | 0·05 „ | 0·05 „ |

Man mache sich vorher entsprechende Verdünnungen der einzelnen Flüssigkeit mit 0·85%iger ClNa-Lösung, so daß jede einzelne der oben angegebenen Mengen in 1 *cm*³ Flüssigkeit enthalten ist. So erreicht man am einfachsten, daß das Gesamtvolumen überall gleich ist. Jedes Röhrchen enthält somit insgesamt 3 *cm*³ Flüssigkeit. Ist das nicht der Fall, so fülle man sie mit 0·85%iger ClNa-Lösung auf 3 *cm*³ auf. Diese Mischung wird für eine Stunde in den Brutschrank von 37° gesetzt. Alsdann fügt man zu jedem einzelnen Röhrchen hinzu:

*D* 5%ige Hammelblutaufschwemmung 1 *cm*³
*E* Ambozeptorverdünnung . . . . 1 „

Die Ambozeptorverdünnung sei so gewählt, daß 1 *cm*³ die durch den Vorversuch zu bestimmende, 2—2½fache Menge der lösenden Dosis enthält. Die Titerstellung des Ambozeptors erfolgt wie oben angegeben.

Nunmehr kommt die Mischung wieder für 2 Stunden in den Brutschrank.

Enthielt die Flüssigkeit *A* Pferdeserumeiweiß, so tritt in den mittleren Röhrchen keine Hämolyse ein. Ein Überschuß des Präzipitogens kann die Reaktion hemmen, daher kann unter Umständen in Röhrchen 1 die Hämolyse eintreten. Ebenso hat die Reaktion nach unten hin eine Grenze, und es könnte unter Umständen auch in Röhrchen 4 Hämolyse eintreten. Jedoch ist die untere Grenze bei einem nicht zu unempfindlichen Präzipitin sehr tief, bei weniger als $^1/_{1000000}$ $cm^3$ Pferdeserum. Die untere Grenze ist recht scharf, so daß man darauf ganz gut eine quantitative Bestimmung des Präzipitogens gründen kann, welche genauer sein dürfte als die direkte Präzipitation. Man prüft einfach, welche Verdünnung der zu untersuchenden Flüssigkeit gerade eben keine totale Hemmung der Hämolyse bewirkt und vergleicht damit, wieviel reines Pferdeserum denselben Effekt hat.

Zu jedem Versuch gehören aber unbedingt stets noch folgende, gleichzeitig anzusetzende Kontrollen:

1. Die negative Kontrolle. Sie enthält statt der Flüssigkeit *A* 0·85%ige ClNa-Lösung. Hier muß natürlich Hämolyse eintreten, und zwar nicht schneller als in $^1/_4$ Stunde, nicht später als in 1 Stunde. Es wird hiermit bewiesen, daß *B* an sich die Hämolyse nicht hemmt.

2. Die Prüfung des hämolytischen Systems (Ambozeptor + Komplement) auf seine Wirksamkeit. Hier wird *A* und *B* durch ClNa-Lösung ersetzt, sonst alles ebenso behandelt, also auch eine Stunde im Brutschrank gelassen, dann *D* und *E* zugefügt. Es muß rasch (d. h. in etwa 15 bis 30 Minuten) Hämolyse erfolgen, da ja die mehrfach lösende Dosis Ambozeptor zugegen ist.

Ein gut gelungener Versuch verläuft derart, daß die Lösung in der negativen Kontrolle nicht schneller als in 25 Minuten, nicht langsamer als in 40 Minuten erfolgt. Ist das nicht der Fall, so muß man die Menge des Ambozeptors derartig verändern, daß dieser Bedingung genügt wird und den Versuch wiederholen.

Die Methode der Komplementablenkung ist sehr empfindlich und dabei durchaus eindeutig. Sie erfordert aber viele Vorbereitungen und eine gute Einübung.

Besonders für quantitative Eiweißbestimmungen[1]) ist diese Methode genauer als die direkte Präzipitation. Man bestimmt zu diesem Zweck diejenige Verdünnung der zu untersuchenden Flüssigkeit, welche gerade noch vollkommene Hemmung der Hämolyse erzeugt und vergleicht diese mit derjenigen auszuprobierenden Verdünnung der bekannten freien Eiweißlösung, die denselben Effekt hervorbringt.

[1]) *U. Friedemann* und *S. Jaac,* Weitere Untersuchungen über den parenteralen Eiweißstoffwechsel, Immunität und Überempfindlichkeit. Zeitschr. f. exper. Path. u. Ther. Bd. 4. S. 18 (1907).

## IV. Die Wassermannsche Serumreaktion.

Eine ganz besondere Anwendung hat die Methode der Komplementbindung in der *Wassermann*schen Reaktion des Blutserums[1] gefunden, welche bei syphilitischen Erkrankungen beim Menschen auftritt. Diese Methode wurde auf Grund einer, wie sich später herausstellte, nicht ganz zutreffenden Voraussetzung *Wassermanns*, also eigentlich durch einen Zufall, gefunden. Die Bedeutung der Reaktion, die zunächst einen rein medizinisch-praktischen Zweck hat, dürfte aber in Zukunft auch der Ausgangspunkt für theoretische Erkenntnisse sein.

Die Idee, von der *Wassermann* ausging, war folgende: Man konnte vermuten, daß, wie etwa beim Typhus abdominalis, während der Erkrankung auch bei der Syphilis sich ein Antikörper im Blute bilde, der spezifisch gegen die Spirochäten gerichtet sei. Dieser Antikörper konnte entweder ein Agglutinin sein oder ein „Ambozeptor" nach der *Ehrlich*schen Nomenklatur, d. h. ein Antikörper, der nicht für sich, sondern nur bei Gegenwart von Komplement auf die Spirochäten wirkte. Dabei wurde ganz offen gelassen, in welcher Weise diese Wirkung vor sich gehe, und es wurde nur versucht zu zeigen, daß beim Zusammenbringen des syphilitischen Blutserums mit Spirochäten ein ferner noch dazu gegebenes Komplement gebunden wird. Da nun reine Spirochäten nicht zu erhalten sind, so nahm *Wassermann* einen wässerigen Extrakt aus den Lebern von kongenital syphilitischen Föten, deren hoher Spirochätengehalt ja durch *Levaditis* Methode festgestellt war. In der Wahl dieses Objektes liegt der glückliche Zufall. Es stellte sich nämlich heraus, daß die Reaktion in dem zu erwartenden Sinne eintrat, aber sehr bald erwies sich, daß erstens die Reaktion dem Sinne ähnlich, wenn auch schwächer, mit Normallebern erfolgte (*Marie* und *Levaditi*[2]), *L. Michaelis*[3]), daß es ferner gar nicht auf die Spirochäten ankam, sondern daß nach *Porges* und *Meier*[4]) sowie *Landsteiner* und *Poetzl*[5]) die alkoholischen Auszüge solcher Lebern ebensogut wirksam waren, und noch weiter fand sich, daß normale Lebern einen im Prinzip ebenso, wenn auch nicht jedesmal so zuverlässig wirksamen Extrakt lieferten. Weiterhin zeigte *Landsteiner*, daß das Herz

---

[1]) *A. Wassermann*, *A. Neisser* und *C. Bruck*, Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis. Deutsche med. Wochenschr. Jg. **1906**. S. 745. Die vollständigste Literaturquelle über zahllose Nachuntersuchungen und die zum Teil sehr erhebliche Erweiterung der ursprünglichen Angaben und Kenntnisse und die zum anderen Teil nicht immer zweckmäßigen Modifikationen der Methodik finden sich bei *C. Bruck*, Die Serodiagnostik der Syphilis. Berlin 1909.

[2]) *Marie* und *Levaditi*, Recherches sur la réaction de W. Ann. *Pasteur*. T. 21. p. 2 (1907).

[3]) *L. Michaelis*, Die *Wassermann*sche Syphilisreaktion. Berliner klin. Wochenschr. Jg. **1907**. Nr. 35.

[4]) *Porges* und *Meier*, Über die Rolle der Lipoide bei der W.schen Reaktion. Berliner klin. Wochenschr. Jg. **1908**. S. 731.

[5]) *Landsteiner*, *Müller* und *Poetzl*, Zur Frage der Komplementbindungsreaktion bei Syphilis. Wiener klin. Wochenschr. Jg. **1907**. Nr. 50.

von Meerschweinchen, und *Michaelis*[1]), daß das Herz von nicht syphilitischen Menschenleichen einen vorzüglichen Ersatz der syphilitischen Leber darstellten. Offenbar ist das Wirksame ein Lipoid, welches sich aber nicht in allen Organen findet, selbst wenn sie an sich reichlich Lipoide enthalten. In gewisser Beziehung ist sogar eine Aufschwemmung von Lezithin und anderen einfachen Lipoiden als Ersatz zu gebrauchen, jedoch nicht als vollwertiger und zuverlässiger Ersatz. Einen besseren Ersatz bieten Kombinationen von Lezithin und Seifen nach *H. Sachs* und *Altmann.*

Das Wesen der *Wassermann*schen Reaktion ist demnach folgendes: In dem Serum von syphilitischen Menschen findet sich ein unbekannter Stoff, der mit einem geeigneten Lipoid eine Verbindung eingeht, welche ein noch außerdem zugesetztes Komplement in irreversibler Weise bindet. Der Nachweis der Bindung bzw. Nichtbindung des Komplements geschieht in der Weise, daß man nachträglich zu dem Gemisch Blutkörperchen irgend einer Tierart zugibt und außerdem komplementfreien, auf diese Blutart wirksamen Ambozeptor, in Form eines Kaninchenserums, welches infolge von Vorbehandeln des Kaninchens mit der betreffenden Blutkörperchenart einen Ambozeptor enthält. Ist nun das vorher zugegebene Komplement gebunden worden, so tritt keine Hämolyse ein, ist es noch frei, so lösen sich die Blutkörperchen. Im ersten Fall spricht man von einer positiven, im zweiten von einer negativen Luesreaktion.

Demnach gehören zu einer Reaktion 5 verschiedene Substanzen, deren zweckmäßigste Gewinnung nunmehr beschreiben werden soll.

1. Das Serum des Kranken. Man entnimmt es am zweckmäßigsten aus der Vena mediana der Ellenbogenbeuge. Der Oberarm wird wie zum Aderlaß mit einer elastischen Gummibinde oder einfach mit einer Mullbinde leicht umschnürt, nach dem sichtbaren Hervortreten der Medianvene und Desinfektion der Haut mit einer Kanüle eingestochen und das Blut in einem Reagenzglas oder in einem Zentrifugierglas aufgefangen. Die Kanüle kann die einer größeren Pravazspritze zugehörige sein, d. h. nicht gar zu eng. Man kann das Blut in eine 5 *cm*³ enthaltende Spritze aspirieren oder aber, wenn man eine etwas stärkere Kanüle nimmt, auch von selbst abtropfen lassen. Man entnehme etwa 5 *cm*³ Blut. Man lasse es ruhig gerinnen, löse das geronnene Blut von der Wand des Reagenzglases ab und warte die spontane Absetzung des Serums ab. Man kann das Serum auch, wie oben beschrieben, nach dem Gerinnen abzentrifugieren. Das abgehobene, vollständig klare, nötigenfalls noch einmal zentrifugierte Serum wird dann im Wasserbad in einem Reagenzglas $^1/_2$ Stunde auf 55° erwärmt und damit inaktiviert. Sollte das Serum gelöstes Hämoglobin enthalten, so stört dieses nicht. Das so gewonnene Serum hält sich auf Eis mehrere Tage unverändert, es kann auch zweckmäßig eingefroren aufbewahrt werden und hält sich dann noch viel länger. Monate altes Serum benutze man jedoch nicht, weil es wahrscheinlich ist, daß der

[1]) Berliner med. Gesellschaft, Sitzung vom 11. März 1908.

Ausfall der Reaktion durch allzulanges Aufbewahren auch ohne Fäulnis beeinflußt wird.

2. **Der Lipoidextrakt.** Man wähle zwischen folgenden Extrakten:

*a)* **Der wässerige Extrakt aus syphilitischen Lebern.** Von syphilitischen Föten der letzten Schwangerschaftsmonate oder auch reifer, totgeborener syphilitischer Kinder wird die Leber herauspräpariert. Allzugroße Ansprüche an Frischheit des Materials braucht man nicht zu stellen; ja die herauspräparierte Leber ist auch noch am nächsten Tage brauchbar, wenn sie kühl aufbewahrt wird. Man zerschneide ein abgewogenes Stück der Leber zunächst grob und zerkleinere es unter Zusatz von ganz wenig Seesand im Mörser zu einem feinen Brei, fülle diesen Brei in eine Flasche und setze das 10fache des Gewichtes des Leberstückes von folgender Flüssigkeit hinzu: 0·85%ige Cl Na-Lösung 900 *cm*³, 5%ige wässerige Phenollösung 100 *cm*³. Man gebe in die Flasche noch eine Handvoll Glasperlen und schüttle das Ganze 8 Stunden im Schüttelapparat. Dann stelle man die Flasche in den Eisschrank, lasse sie 2—3 Tage stehen und hebe dann die überstehende Flüssigkeit ab. Starkes Zentrifugieren sollte man vermeiden. Am besten läßt man das Sediment sich spontan absetzen und nimmt zum Gebrauch Proben der überstehenden Flüssigkeit, die etwas opaleszent ist, aber keine gröberen Partikel enthalten darf. Zum Gebrauch entnehme man 1 *cm*³ mit der Pipette und verdünne mit 4—5 Teilen 0·85%iger Cl Na-Lösung. Dieses ist gewöhnlich das wirksamste Verdünnungsverhältnis. Die Verdünnung verwerfe man nach 24 Stunden. Die Stammlösung hält sich bei gut gelungenen Extrakten oft monatelang ganz unverändert. Wovon es abhängt, daß ein solcher Extrakt gut wird, ist nicht sicher zu sagen, es ist Glücksache. Die syphilitischen Veränderungen sind es jedenfalls nicht, die die Güte bedingen, wenn auch im allgemeinen syphilitische Lebern viel bessere Extrakte geben als normale. Es ist möglich, daß der besondere Mazerationszustand der syphilitischen Leber von Bedeutung für das Gelingen ist.

*b)* **Der alkoholische Leberextrakt.** Man verfahre, wie oben, bis zur Bereitung des Breies im Mörser. Dann schüttle man, statt mit dem obigen Cl Na-Phenolgemisch, mit absolutem Alkohol, und zwar mit der 5fachen Menge des Lebergewichtes, füge Glasperlen zu, schüttle 6 Stunden, lasse bis zum nächsten Tage stehen und filtriere bis zur völligen Klarheit den alkoholischen Extrakt ab. Dieser ist sehr haltbar und bleibt dauernd klar. Für den Versuch entnehme man 1 *cm*³ Extrakt und gebe dazu das 5—6fache an 0·85%iger Cl Na-Lösung, indem man zu dem alkoholischen Extrakt die Cl Na-Lösung auf einmal plötzlich zufließen läßt. Es entsteht eine leicht milchige Flüssigkeit, die man nur für einen Tag verwenden darf.

*c)* Am meisten möchte ich, entgegen den Bedenken, die von mancher Seite geäußert wurden, den **alkoholischen Extrakt von normalen menschlichen Herzen** (auch Tierherzen sind verwendbar, nur muß man für jede Tierart das richtige Verdünnungsverhältnis besonders auspro-

bieren) empfehlen. Menschliche Herzmuskulatur wird mit dem Hackmesser zu einem möglichst feinen Brei verarbeitet und mit der 10fachen Gewichtsmenge absolutem Alkohol unter Zusatz von einigen Glasperlen 6 Stunden geschüttelt. Am nächsten Tage wird abfiltriert. Die kaum gelbliche Flüssigkeit ist auch bei Zimmertemperatur fast unbegrenzt haltbar. Zum Gebrauch verdünne man 1 *cm*³ Stammextrakt mit 5—7 Teilen 0·85⁰/₀iger ClNa-Lösung in derselben Weise, wie es beim Leberextrakt beschrieben ist.

Der Vorteil der alkoholischen Extrakte ist der, daß die aus ihnen bereiteten frischen wässerigen Lipoidemulsionen an sich so gut wie kein Komplement binden, während bei Extrakten, die in wässerigen Gemischen aufbewahrt werden, die eigene Komplementbindungsfähigkeit oft störend ins Gewicht fällt; ferner fällt dieser Extrakt sehr gleichmäßig aus.

3. Das Komplement. Man bereite es in der oben beschriebenen Weise (S. 1193) und bewahre es, wenn überhaupt, in 10fach mit 0·85⁰/₀iger ClNa-Lösung verdünntem Zustand eingefroren auf. Für 5—6 Tage geht das einwandfrei.

4. Die Blutkörperchen werden, wie oben beschrieben, zu einer 5⁰/₀igen Aufschwemmung verarbeitet. Man nehme nur Hammelblutkörperchen und lasse sich auf kein anderes Material ein. Da die ganze Reaktion rein empirisch ist, setze man sich durch Änderung des Materials keinen unüberblickbaren Fehlerquellen aus.

5. Der hämolytische Ambozeptor wird nach den oben gegebenen Regeln gewonnen. Man bestimme die einfach lösende Dosis, d. h. für unseren Fall diejenige Menge des inaktivierten Ambozeptors, welche in 1 *cm*³ der Blutkörperchenaufschwemmung bei Gegenwart von 0·1 *cm*³ frischem Meerschweinchenserum als Komplement und bei einem Gesamtvolumen der Flüssigkeit von 5 *cm*³ nach zweistündigem Aufenthalt im Brutschrank bei 37⁰ gerade vollständige Hämolyse hervorbringt. Für den eigentlichen Ablenkungsversuch nehme man nun das 2¹/₂—3fache dieser Dosis und man verdünne das Ambozeptorserum zweckmäßig derart, daß 1 *cm*³ der Verdünnung gerade diese Menge enthält. Der eigentliche Versuch wird nun in folgender Weise angestellt:

Man fülle in ein Reagenzglas von gewöhnlicher Größe zunächst 0·2 *cm*³ des zu untersuchenden inaktivierten Menschenserums und dazu, um es auf 1 *cm*³ aufzufüllen, 0·8 *cm*³ einer physiologischen ClNa-Lösung. Dazu gebe man 1 *cm*³ des nach oben beschriebener Methode verdünnten Lipoidextraktes [1]) und dann 1 *cm*³ des frischen, 10fach verdünnten Meerschweinchen-

[1]) Um das Einfüllen gleicher Flüssigkeitsquanten in eine ganze Reihe von Reagenzgläsern zu erleichtern, was auch sonst bei Untersuchungen von Antikörpern und Fermenten vorkommt, habe ich eine automatische Serienpipette anfertigen lassen (Vereinigte Fabr. f. Laboratoriumsbedarf). Sie besteht 1. aus einem zylindrischen Vorratsraum, 2. aus einem mit kalibrierter Delle versehenen Glashahn und 3. dem Abflußrohr. Durch Drehung des Glashahns erfolgt automatisch abwechselnd die Füllung der geaichten Delle aus dem Vorratsraum und ihre Entleerung durch das Abflußrohr. Die Genauigkeit der Messung ist für den Zweck durchaus befriedigend. Vorläufig werden diese Pipetten für je 1·0 *cm*³ und für je 0·5 *cm*³ angefertigt.

serums als Komplement, bei Anwendung der alkoholischen Extrakte ist es vorteilhaft, mit 15—20fach verdünntem Meerschweinchenserum zu arbeiten. Nun stelle man das Gemisch für eine Stunde in den Brutschrank bei 37°. Dann füge man 1 *cm*³ der Ambozeptorverdünnung, welche also in 1 *cm*³ $2^1/_2$ bis höchstens lösende Dosen enthält, hinzu, und schließlich 1 *cm*³ der Blutkörperchenaufschwemmung. Dann stelle man das ganze wieder in den Brutschrank bei 37° und beobachte den Verlauf der Hämolyse. Eine negative Reaktion besteht darin, daß innerhalb einer Stunde Hämolyse eintritt, eine positive darin, daß weder innerhalb dieser Stunde, noch bei weiterem Aufbewahren auf Eis nach 24 Stunden eine komplette Hämolyse eintritt.

Nun mache man es sich zum unverbrüchlichen Prinzip, niemals einen einzelnen Versuch anzusetzen, sondern stets eine ganze Reihe. Den ersten Versuch setze man derart an, daß man an Stelle des Patientenserums die gleiche Menge ClNa-Lösung nimmt. Das ist die „leere Kontrolle". Hier muß natürlich nach 1 Stunde Hämolyse eintreten. Den zweiten Versuch setze man gleichzeitig mit dem Serum eines Patienten an, der Syphilis hat und nach Maßgabe einer früheren Versuchsreihe eine positive Reaktion gegeben hat. Diese Reaktion muß wieder unzweideutig positiv ausfallen. Als dritten Versuch nehme man ebenso ein notorisch negativ reagierendes Serum. Diese beiden Röhrchen sind die „positive" und die „negative" Kontrolle. Nun erst kommen die eigentlich zu untersuchenden Serumproben, von denen man beliebig viele gleichzeitig ansetzen kann.

Man setze diese ganze Reihe derart an, daß man in die Gläser zuerst nacheinander (mit lauter frischen Pipetten!) die einzelnen Sera einfüllt, dann in alle Röhrchen (mit einer und derselben Pipette) den Extrakt, dann ebenso das Komplement. Nach einer Stunde Aufenthalt im Brutschrank gebe man in alle Röhrchen Ambozeptor und Blutkörperchen. So sind alle Röhrchen bis auf wenige Minuten gleichzeitig angesetzt und man kann sie gleichzeitig beobachten.

Man beachte nun folgendes: Am frühesten tritt die Hämolyse in der Regel in den negativ reagierenden Seren ein. Meist erst darauf folgt die leere Kontrolle. Das kommt daher, daß das Menschenserum einen natürlichen Ambozeptor gegen Hammelblutkörperchen enthält, dessen Wirkung sich zu der des zugesetzten addiert und die Hämolyse beschleunigt. Diese Beschleunigung ist aber ohne erkennbare Ursache bei verschiedenen Seren verschieden, manchmal auch gar nicht vorhanden. Man beachte, daß die Hämolyse in keinem Röhrchen vor Ablauf von frühestens 10 Minuten beginnt, andernfalls war die zugesetzte Ambozeptormenge zu groß. Man beachte, daß nach 1 Stunde die Hämolyse in der leeren Kontrolle beendet sein muß, andernfalls war die zugesetzte Ambozeptormenge zu klein.

Um sich zu vergewissern, daß die Seren ohne den Lipoidextrakt nicht schon komplementablenkend wirken, was manchmal vorkommt, setze man ferner die ganze Versuchsreihe noch einmal an, indem man an Stelle des Lipoidextraktes ClNa-Lösung nimmt. Nur diejenigen Seren sind

für die Reaktion zu gebrauchen, welche nicht an sich ohne Lipoidextrakt komplementbindend wirken. Man kann nun verschiedene Grade der Reaktion unterscheiden. Am einwandfreiesten wäre es wohl, unter sonst gleich gehaltenen Bedingungen diejenige Menge des Menschenserums auszuprobieren, welche die Reaktion gerade noch deutlich gibt. Man wird so Fälle finden, bei denen die Reaktion mit 0·2 $cm^3$ gelingt, mit 0·1 $cm^3$ nicht mehr usw. Diese umständliche Methode kann aber einfacher folgendermaßen ausgeführt werden. Man gebe immer die Menge 0·2 $cm^3$ zu, unterscheide aber zwischen folgenden Stufen der Reaktion. Negative Reaktion: die Hämolyse tritt früher oder gleichzeitig mit der leeren Kontrolle ein. Zweifelhafte Reaktion: die Hämolyse tritt merklich später als die leere Kontrolle ein. Sichere, schwächere Reaktion: nachdem die leere Kontrolle gelöst ist, ist in der zu untersuchenden Probe noch keine merkliche Lösung eingetreten, und nach 24stündigem Aufbewahren im Eisschrank ist die Hämolyse stärker geworden, aber nicht ganz komplett. Ein Teil der Blutkörperchen findet sich als Sediment vor. Starke Reaktion: auch nach 24stündigem Aufbewahren im Eisschrank ist die Hämolyse ganz ausgeblieben.

Nach den übereinstimmenden Angaben von *Citron*[1]) und zahlreicheren späteren Untersuchern[2]) findet sich die Reaktion positiv in 80% der Fälle, welche überhaupt an Syphilis gelitten haben. Bestehen syphilitische Symptome zur Zeit der Untersuchung, so steigt der Prozentsatz auf 90—95%, und alte Syphilitiker ohne Symptome haben etwa in der Hälfte der Fälle positive Reaktion. Die Fälle von progressiver Paralyse geben nach den übereinstimmenden Resultaten aller Beobachter fast 100% positive Resultate. In diesen Fällen kann man auch die durch Lumbalpunktion entnommene Zerebrospinalflüssigkeit statt des Blutserums verwenden. Man behandle sie ganz genau wie Blutserum. Die Frage, ob nicht gelegentlich bei anderen Erkrankungen eine positive Reaktion vorkommt, soll hier nicht entschieden werden. Auf jeden Fall ist es eine sehr große Seltenheit.

Man kann die Reaktion nicht in dem Sinne als spezifisch betrachten, wie etwa eine Präzipitinreaktion oder die Agglutinationsreaktion auf Bazillen beim Typhus, weil an der Reaktion die spezifischen Erreger der Syphilis in erkennbarer Weise nicht beteiligt sind. Trotzdem ist, rein empirisch betrachtet, die Reaktion ein beinahe konstantes, oft das einzige Symptom bei Syphilis.

Zum Schluß sei noch darauf hingewiesen, daß die *Wassermann*sche Reaktion die höchsten Ansprüche an Erfahrung und Übung von seiten des Untersuchers verlangt und daß anfängliche Mißerfolge nicht abschrecken sollen. Das Instandhalten der vielen, teilweise mit der Zeit veränderlichen Versuchsflüssigkeiten erfordert fast eine ganze Arbeitskraft für sich.

Von denjenigen Modifikationen der Reaktion, welche entweder den künstlichen Ambozeptor durch den eigenen natürlichen Ambozeptor

[1]) *J. Citron,* Serodiagnose der Syphilis. Berliner klin. Wochenschr. Jg. **1907**. Nr. 43.
[2]) Literatur siehe bei *Bruck,* l. c.

des Patientenserums ersetzen wollen, oder welche das künstlich zugesetzte Komplement durch das natürliche Komplement des — in diesem Falle unerhitzt angewandten — Patientenserums ersetzen wollen, möchte ich dringend abraten, wenn sie auch gelegentlich eine scheinbare Vereinfachung darstellen. Die verschiedene „Empfindlichkeit" der einzelnen Modifikationen beruht nur darauf, daß die in etwas stereotyper Weise gehandhabte Dosierung des Komplements und Ambozeptors nicht unter allen Bedingungen die günstigste ist. Ganz besonders beruht die verschiedene „Empfindlichkeit verschiedener Antigenextrakte", d. h. ihre Fähigkeit, auch schwach reagierende Seren als sicher positiv reagierend zu erkennen, im wesentlichen darauf, daß man sich oft nicht die Mühe genommen hat, für jede Abart des Antigenextraktes die günstigste Komplementmenge auszuprobieren.

## ANHANG.

### Antikörper, welche als Fermente wirken.

Wie *Abderhalden* und seine Mitarbeiter (*Pinkussohn*, *Weichardt*, *Brahm* u. a.[1]) neuerdings gefunden haben, entstehen durch Injektion von allen möglichen Eiweißkörpern und ihren Spaltungsprodukten Antikörper, welche ihrem Wesen nach nichts anderes sind als peptolytische Fermente. Sie haben nicht die Spezifizität der übrigen Antikörper. Ihr Nachweis geschieht daher in derselben Weise, wie überhaupt peptolytische Fermente nachgewiesen werden (siehe das Kapitel „Fermente"). Als besonders geeignet wird von *Abderhalden* die optische Methode empfohlen. Das Serum des Meerschweinchens enthält schon im natürlichen Zustande diese Fermente.

[1]) Vgl. *Emil Abderhalden*, Die Anwendung der „optischen Methode" auf dem Gebiete der Immunitätsforschung. Medizin. Klinik. Nr. 41. 1909.

# Die wichtigsten Methoden beim Arbeiten mit Pilzen und Bakterien.

Von **Franz Fuhrmann.**

## Einleitung.

Die vorliegende Bearbeitung der biochemischen Methoden beim Arbeiten mit Pilzen und Bakterien bietet keineswegs eine umfassende Darstellung aller Arbeitsmethoden, deren sich der Mykologe bedient hat und noch bedient. Es ist nur eine kleine Auswahl erprobter Arbeitsrezepte gegeben, die vor allem ein sicher einwandfreies Arbeitsmaterial zu gewinnen ermöglichen. Deshalb ist das Hauptgewicht auf eine eingehende Darstellung der Sterilisations- und Reinzuchtmethoden gelegt worden. Die wenigen mikrochemischen Reaktionen auf Inhaltsstoffe von Pilzen und Bakterien sollen nur die Möglichkeit einer Orientierung über die Chemie derselben bieten und dementsprechend nur zu Vorversuchen für die mikrochemischen Operationen dienen, die an anderen Stellen dieses Handbuches ausführlich behandelt sind.

Nochmals sei betont, daß der Zweck der vorliegenden Bearbeitung darin liegt, den auf mykologischen Gebieten weniger eingearbeiteten Forscher in die wichtigsten der wichtigen Methoden für die Gewinnung und Untersuchung der pflanzlichen Mikroorganismen einzuführen und mit denselben vertraut zu machen.

## I. Sterilisationsverfahren.

Zur Sterilisation verwendet man entweder chemische oder physikalische Eingriffe, welche alle lebenden Pilze oder Bakterien bzw. deren Dauerformen sicher vernichten, wobei immer darauf Bedacht zu nehmen ist, daß durch sie weder eine chemische Veränderung der betreffenden Substrate herbeigeführt wird, noch Stoffe hineingelangen, die ein späteres Wachstum von Bakterien oder Pilzen verhindern.

Für die Herstellung der Nährsubstrate kommen demnach nur die physikalischen Sterilisationsmethoden in Frage und von diesen vornehmlich die Sterilisation durch trockene Wärme, die Sterilisation durch feuchte Wärme und die Sterilisation durch Filtration.

### a) Sterilisation durch trockene Wärme.

Diese wird in eigens dazu gebauten, doppelwandigen Schränken aus Kupferblech („Heißluftsterilisatoren“) vorgenommen und dort angewendet, wo es sich um die Sterilisierung von Gegenständen handelt, die eine trockene Erhitzung über 100° ohne Schaden aushalten. Fig. 349 zeigt uns einen derartigen Blechkasten, der außen mit Asbest bekleidet ist und im Innenraum mehrere Etagen zur Aufnahme besitzt. Sämtliche Gegenstände sind in trockenem Zustande hineinzubringen. Man wird alle in der Mykologie mit Kulturen in Berührung kommenden Glas- und Metallgegenstände dieser Sterilisierung unterwerfen. Die zur Aufnahme von Nährsubstanzen bestimmten Proberöhrchen und Kolben werden nach tadelloser mechanisch-chemischer Reinigung mit einem Wattebausch von entfetteter oder nicht entfetteter Baumwolle[1]) verschlossen und in diesem Zustande durch 2 Stunden einer Erhitzung von 155—160° C ausgesetzt. Dann läßt man sie langsam bei verschlossenem Kasten auskühlen, worauf sie gebrauchsfertig sind. Auch alle nicht mit Weichlot gelöteten Utensilien werden dieser Sterilisierung unterworfen. Die Kulturschalen sind ebenso zu behandeln, nur ist es sehr zweckmäßig, dieselben vor dem Sterilisieren in Papier einzeln zu verpacken und sie erst unmittelbar vor dem Gebrauche auszuwickeln, da sonst bei großen Temperaturschwankungen mit der einströmenden Luft Pilzsporen und Bakterien eingesaugt werden können, was zu störenden Verunreinigungen führt.

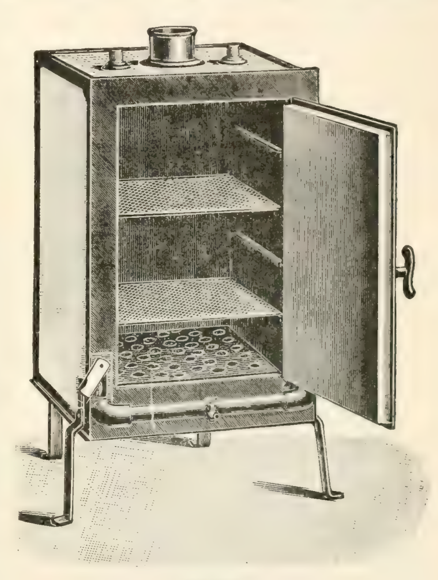


Fig. 349.

Für die Sterilisation von Blutserum und überhaupt von Substanzen, die bei höheren Temperaturen koagulieren, benutzt man Temperaturen von 50—65° C, die man entweder mehrere Tage einwirken läßt oder aber

[1]) Nur bei besonders subtilen chemischen Untersuchungen verdient der Watteverschluß mit gereinigter Baumwolle den Vorzug. Für die gewöhnlichen Kulturen ist dagegen die nicht entfettete Watte als Verschlußmaterial vorzuziehen, da sie nicht Feuchtigkeit anzieht und somit vor der Durchwachsung mit Schimmelpilzen geschützt ist.

in bestimmten Zeitinterwallen zu wiederholten Malen. Auch hier dienen dazu doppelwandige Schränke, welche aber eine Wasserfüllung enthalten und bei denen der Innenraum durch die gleichmäßig erwärmte Wasserschicht auf dieser Temperatur dauernd erhalten wird.

Impfnadeln, Federzangen, überhaupt nicht weich gelötete Metallgegenstände sterilisiert man unmittelbar vor dem Gebrauch in der offenen Flamme. Desgleichen ist es sehr empfehlenswert, vor dem Eröffnen einer Reinkultur den Wattebausch abzuflammen, um sicher jede Verunreinigung hintanzuhalten. Auch muß der Rand der Eprouvetten oder Kolben vor dem Ausgießen von sterilen Flüssigkeiten abgeglüht werden. Das Auskühlen hat dann in schiefer Lage zu geschehen, damit aus der Luft keine Sporen oder Verunreinigungen in das Innere hineinfallen können.

## b) Sterilisation durch feuchte Wärme.

Diese Art von Sterilisierung wird entweder mit strömendem Wasserdampf von der Temperatur des siedenden Wassers oder mit erhitztem Wasserdampf ausgeführt.

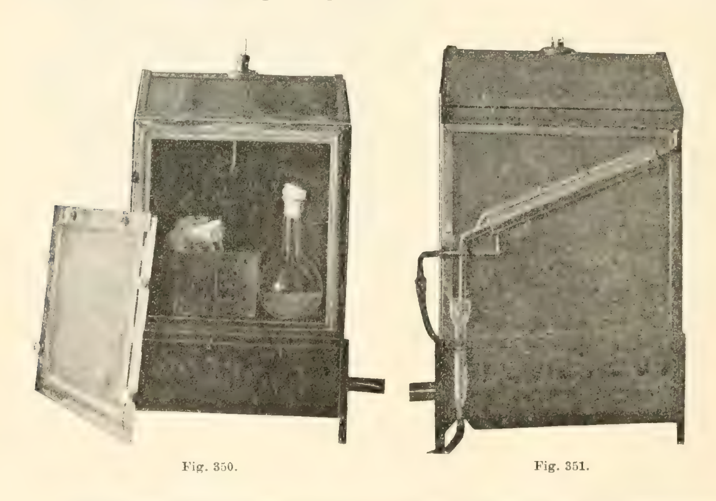


Fig. 350. Fig. 351.

Die Sterilisation im strömenden Wasserdampf wird in besonderen Apparaten ausgeführt, von denen der *Koch*sche Dampftopf wohl der verbreiteste ist. Viel angenehmer im Gebrauch ist folgender Dampfsterilisator.[1]) Dieser besteht aus einem Kupferkasten, dessen Außenwände mit Filz bekleidet sind. Die vordere Wand ist abnehmbar, durch Asbestmasse

[1]) Der Apparat ist von Gustav Eger in Graz, Zingendorfgasse, nach Angabe des Verfassers und Prof. *Reinitzers* angefertigt und ständig erhältlich.

aufgedichtet und durch Schieber angepreßt. Das Dach des Apparates ist steil und enthält eine Öffnung zur Aufnahme des Thermometers. Der untere Teil des Kastens ist rinnenförmig und dient zur Aufnahme des Wassers für die Dampfentwicklung. Der Innenraum (Fig. 350) enthält zwei herausnehmbare durchlochte Kupferbleche, auf die die Gegenstände gestellt werden. Die Heizrinne besitzt einen konstanten Wasserzulauf, der von der Wasserleitung gespeist wird. Die Rückwand ist oben gegen das Dach zu in eine nach außen geschlossene Rinne erweitert, die mit dem Kühlraum eines an der Rückseite angebrachten *Liebig*schen Kühlers in Verbindung steht (Fig. 351). Unter der Heizrinne befindet sich eine Heizschlange. Das von der Wasserleitung kommende Wasser durchströmt zuerst den Mantel des Kühlers, gelangt von dort in den Kühlraum und dann in die Heizrinne des Sterilisators. Der gebildete Dampf durchströmt zuerst den Kasten mit den Gegenständen, kommt dann in die genannte Dampfrinne und von dort in den Kühler, wo er kondensiert wird. Das Kondenswasser strömt wieder mit dem Kühlwasser in den Heizraum des Apparates. Dadurch ist erreicht, daß einerseits kein Dampf ins Laboratorium kommt und andrerseits der Apparat vorgewärmtes Wasser empfängt, somit sehr rasch nach dem Eröffnen wieder maximal erhitzt ist.

Die Sterilisation wird am besten diskontinuierlich in der Weise ausgeführt, daß die Nährsubstanzen etc. dreimal hintereinander durch je 15 Minuten dem strömenden Dampf mit einem Intervall von je 24 Stunden ausgesetzt werden. Während der zwischen liegenden Zeit hält man dieselben am besten bei 18—24° C im Dunkeln. Bei allen mit Erde gemischten Nährsubstraten versagt diese Methode oder ist zumindest sehr unsicher, weshalb an ihre Stelle zu treten hat die

## Sterilisation im erhitzten Wasserdampf.

Dazu verwendet man die sogenannten „Autoklaven“, welche gestatten, durch eine beliebige Zeit eine bestimmte Dampfwärme anzuwenden. Der Autoklav besteht aus einem kupfernen Kessel, dessen Deckel mit einem Bügel niedergeschraubt wird. Der Deckel trägt eine Hahngarnitur mit Sicherheitsventil und ein Manometer (siehe Fig. 352). Sehr zu empfehlen ist der von Lautenschläger in Berlin zuerst angefertigte Manometerregulator, dessen roter Zeiger zuerst auf den gewünschten Druck bzw. auf die diesem entsprechende Temperatur eingestellt wird. Der Apparat wird folgendermaßen in Gang gesetzt. Bei abgenommenem Deckel füllt man die für jeden Apparat angebene Menge Wasser ein, setzt dann den Ständer für die zu sterilisierenden Gegenstände ein, gibt letztere hinein und schließt den Deckel durch gutes Verschrauben. Dann verbindet man das beigegebene Rohr mit dem Dampfauslaßstück und läßt es in einen Topf Wasser ungefähr 5 *cm* unter dem Niveau münden. Hierauf verbindet man den Manometerregulator mit der Gasleitung und dem Brenner und stellt den roten Zeiger auf die gewünschte Temperatur ein. Jetzt ent-

zündet man die Brennerflamme und läßt solange den Dampfabsperrhahn offen, bis keine Luft mehr aus dem Autoklaven entweicht. Dies erkennt man an dem knatternden Geräusch, das luftfreier Dampf beim Entweichen unter Wasser erzeugt. Jetzt verschließt man den Dampfhahn. Sobald sich die beiden Manometerzeiger decken, notiert man die Zeit und rechnet von

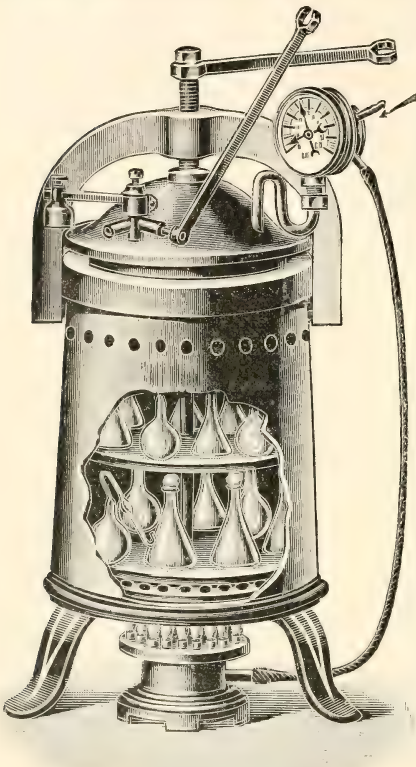
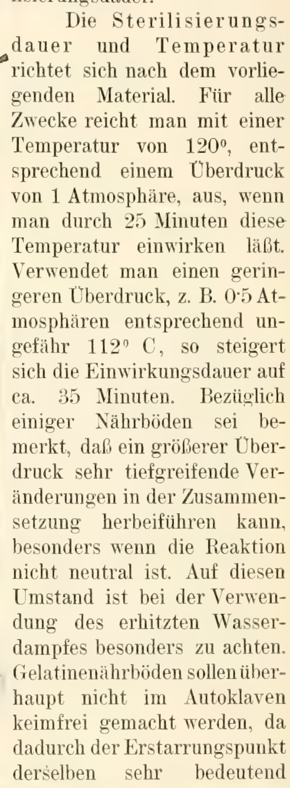


Fig. 352.



diesem Moment an die Sterilisierungsdauer.

Die Sterilisierungsdauer und Temperatur richtet sich nach dem vorliegenden Material. Für alle Zwecke reicht man mit einer Temperatur von 120°, entsprechend einem Überdruck von 1 Atmosphäre, aus, wenn man durch 25 Minuten diese Temperatur einwirken läßt. Verwendet man einen geringeren Überdruck, z. B. 0·5 Atmosphären entsprechend ungefähr 112° C, so steigert sich die Einwirkungsdauer auf ca. 35 Minuten. Bezüglich einiger Nährböden sei bemerkt, daß ein größerer Überdruck sehr tiefgreifende Veränderungen in der Zusammensetzung herbeiführen kann, besonders wenn die Reaktion nicht neutral ist. Auf diesen Umstand ist bei der Verwendung des erhitzten Wasserdampfes besonders zu achten. Gelatinenährböden sollen überhaupt nicht im Autoklaven keimfrei gemacht werden, da dadurch der Erstarrungspunkt derselben sehr bedeutend herabgedrückt wird, ja die Erstarrungsfähigkeit überhaupt vernichtet werden kann.

Bezüglich eines Apparates, welcher für strömenden Dampf sowohl als auch für erhitzten Dampf verwendet werden kann, verweise ich auf *Abba.* [1])

[1]) *Fr. Abba,* Über einen Autoklavenofen für bakteriologische Laboratorien. Zentralblatt f. Bakt. 1. Abt. Bd. **23**. S. 462 (1898).

### c) Sterilisation durch Filtration.

Diese findet überall dort Anwendung, wo eine möglichste Schonung des Nährstoffes am Platze ist oder derselbe ohne wesentliche Veränderung eine Erwärmung überhaupt nicht zuläßt. Auch hier muß überlegt werden, ob nicht etwa in dem Substrate Stoffe vorliegen, die von Bedeutung sind, aber vom Filter zurückgehalten werden, wie bestimmte Anteile von Blutserum, dann gewisse Enzyme usw.

Für die Filtration von Flüssigkeiten eignen sich besonders Schichten von mineralischen porösen Substanzen, wie gebranntem Ton, Asbest und Kieselgur. Besonders empfehlenswert sind die in verschiedenen Größen erhältlichen Chamberlandkerzen aus gebrannter Porzellanerde, wie sie die Berliner Porzellanmanufaktur in den Handel bringt. Auch die von *Berkefeld* ausgeführten Filter aus gepreßter Infusorienerde sind brauch-

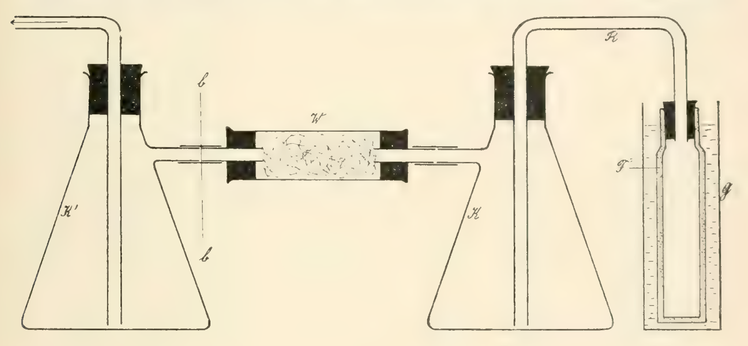



Fig. 353.

bar. Für kleinere Filtratmengen bedient man sich am zweckmäßigsten der verschiedenen Filterkerzen, für größere Mengen der Filterballons, wie beispielsweise des *Pukall*schen Filters. Alle genannten Filter müssen vor dem Gebrauch einer genauen Revision unterzogen werden, da sie sehr oft kleinste Sprünge und Undichtigkeiten besitzen, die ein keimfreies Filtrieren ausschließen. Die Prüfung auf Dichtigkeit geschieht in der Weise, daß das Filter mit einer Druckluftpumpe in Verbindung gebracht und unter Wasser getaucht wird. Der kleinste Riß läßt sich sofort dadurch erkennen, daß beim Anblasen an der betreffenden Stelle Luftblasen austreten. Solche schadhafte Filter sind für die Zwecke des keimfreien Filtrierens vollständig untauglich.

Von verschiedenen Seiten werden die erdenklichsten Filterzusammenstellungen ersonnen, die neben ihren Lichtseiten auch Schattenseiten besitzen. Eine sehr einfache, für die meisten Zwecke der Nährbodenfiltration ausreichende Zusammenstellung gibt das Schema der Fig. 353 wieder. Man verbindet durch einen Kautschukstopfen das Porzellanfilter *F* luftdicht mit

der Röhre *R*, die durch einen zweiten Kautschukstopfen an den starkwandigen Saugkolben *K* angeschlossen ist. Nun reinigt man das Filter durch längeres Durchsaugen von Brunnenwasser, dann destilliertem Wasser und trocknet es hierauf nach Abnahme vom Stopfen bei 100° im Trockenkasten. Zweckmäßig ist es, sämtliche Filter auszuprobieren und die brauchbaren zu reinigen und in weißes Papier staubsicher eingemacht vorrätig zu halten. Vor dem Filtrieren der Nährflüssigkeiten etc. verbindet man das Filter mit dem Druckkolben *K* in der eben angegebenen Weise und diesen mit dem Wattefilter *W* durch einen Druckschlauch. Das Wattefilter besteht aus einer starkwandigen Glasröhre von 10—12 *cm* Länge und 2 *cm* innerer Lichte. Sie wird mit reiner entfetteter Watte gefüllt und beiderseits mit einfach gebohrten Kautschukstopfen verschlossen, durch die zwei Glasröhren hindurchgehen. Filter, Druckkolben und Wattefilter werden nun eine Stunde hindurch im strömenden Dampf sterilisiert. Nach dem Erkalten wird der zweite Druckkolben *K*, mit einem Druckschlauch an das Wattefilter *W* und an eine Saugpumpe angeschlossen. Jetzt ist das Filter gebrauchsfertig. Die zu filtrierende Nährflüssigkeit kommt in den Zylinder *G* und wird nach Passieren des Filters im Kolben *K* aufgesammelt. Wenn ein Porzellanfilter ohne glasierten Halsteil verwendet wird, ist letzterer nach dem Sterilisieren mit geschmolzenem Paraffin zu bestreichen. Werden sehr trübe Flüssigkeiten filtriert, ist durch einen steifen Borstenpinsel von Zeit zu Zeit die Filteroberfläche abzuscheuern.

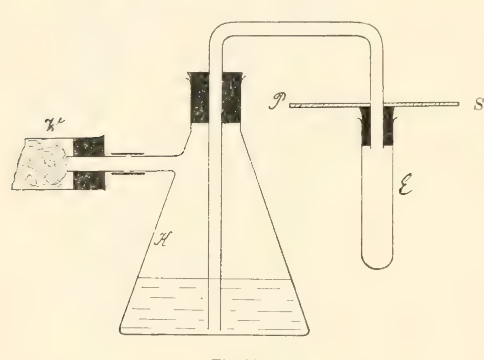



Fig. 354.

Sobald die Filtration beendet ist, entfernt man den Zylinder *G*, saugt noch etwas Luft hindurch und stellt dann die Saugpumpe ab. Hierauf nimmt man eine im Heißluftsterilisator keimfrei gemachte, mit einem Wattebausch verschlossene, kurze Eprouvette, die den gleichen inneren Durchmesser wie der Filterhals besitzt, entfernt den Wattebausch und flammt den Rand des Proberöhrchens in der Bunsenflamme ab. Dann läßt man das Proberöhrchen mit der Öffnung nach unten gewendet auskühlen, entfernt nun rasch das Filter und setzt an dessen Stelle die Eprouvette, wie es im Schema der Fig. 354 wiedergegeben ist.

Hier sehen wir die keimfrei filtrierte Flüssigkeit im Kolben, der noch das Wattefilter trägt, um eine Infektion zu vermeiden. An Stelle des Filters befindet sich das kurze Proberöhrchen *E*, das den Inhalt ebenfalls

vor einer Infektion von dieser Seite schützt. Ein derartig gewonnenes und aufbewahrtes Substrat hält sich unbegrenzt keimfrei. Will man daraus Flüssigkeit entnehmen, so setzt man an das Wattefilter ein Doppelgebläse aus Kautschuk unter Zwischenschaltung eines Quetschhahnes. Über dem Kautschukstopfen *S* bringt man eine Pappscheibe *P*, die im Zentrum eine dem Rohrdurchmesser entsprechende Bohrung und einen radiären Schlitz besitzt, um sie leicht aufstecken zu können. Die Pappscheibe wird mit 70%igem Alkohol unmittelbar vor dem Abzapfen von Flüssigkeiten getränkt. Man stellt sich nun die zu füllenden, selbstverständlich vorher im Heißluftschrank sterilisierten und mit einem Wattebausch verschlossenen Gefäße zurecht, setzt das Kautschukgebläse bei geschlossenem Quetschhahn unter Druck und entfernt die Eprouvette *E*. Man hat jetzt nur die zu füllenden Gefäße knapp unter das Rohr zu halten und den Quetschhahn vor dem Wattefilter zu öffnen, um die Flüssigkeit in gewünschter Menge austreten zu lassen.

Handelt es sich um das Abfüllen genau bestimmter Volumina, so verwendet man an Stelle des Kolbens *K* einen Meßzylinder, der einen doppelt durchbohrten Stopfen trägt.

Die Sterilisation von Gasen wird am zweckmäßigsten durch Wattefilter vorgenommen. Ein solches Filter ist schon bei der Zusammenstellung des Porzellanfilters auf Seite 1210 beschrieben. Wegen der verwendeten Kautschukstopfen müssen derartige Filter immer im strömenden Dampf vor dem Gebrauch sterilisiert werden. Um Luft- oder Gasfilter dauernd keimfrei vorrätig zu

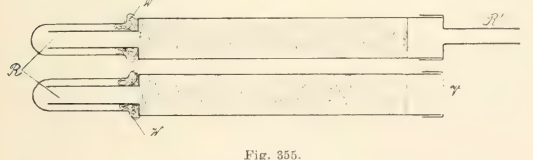


Fig. 355.



Fig. 356.

haben, empfiehlt sich die Herstellung von hartgelöteten Metallbüchsen mit Metallrohransätzen, die mit entfetteter Watte oder Asbestfasern gefüllt sind. Fig. 355 zeigt uns im Querschnitt eine für Filterzwecke sehr geeignete Metallröhre. Die weitere, mit Watte gefüllte Röhre hat einen hart angelöteten Rohransatz *R*. Das offene breite Ende besitzt entweder einen aufsteckbaren Rohransatz *R'* oder eine durchlöcherte Verschlußkapsel *V*. Um den fixen Rohransatz *R* steril zu erhalten und später steril anschließen zu können, versieht man ihn mit einer Schutzkappe aus Glas, die durch die Wattebeilage *W* abgedichtet ist. Vor dem Sterilisieren im Heißluftschrank durch 2 Stunden bei 155° werden diese Filter ohne die aufsteckbaren Rohransätze *K* und *V* in Papier eingewickelt und erst unmittelbar vor dem Gebrauch wieder herausgenommen.

Unter Benutzung der bekannten *Allihn*schen Röhren für die Zuckerbestimmung kann man sehr brauchbare Gasfilter herstellen, wie eines in Fig. 356 im Schnitt abgebildet ist. In das Rohr aus Hartglas kommt ein Platinsieb *P* und auf dieses in dichter Lage ca. 5 *cm* hoch Asbest oder Watte. Der konische Rohransatz wird wie oben angegeben mit einer keimsicheren Schutzkappe versehen. Gerade dieses Filter bewährt sich bei sehr raschem Gebrauch deshalb ausgezeichnet, weil es, mit einer Asbestfüllung versehen, innerhalb weniger Minuten durch unmittelbares Glühen sterilisiert werden kann. In diesem Falle glüht man den mit dem Asbest gefüllten Teil und den Rohransatz aus und gibt das Filter ohne eine besondere kleine Schutzkappe noch sehr heiß in eine weite Eprouvette, wie sie in der Fig. 356 durch die gestrichelte Linie angedeutet ist. Auch hier ist es sehr zu empfehlen, vor dem Einschieben den oberen Rohrteil mit einem Wattekranz *(K)* zu umgeben und so die etwa durch die Saugwirkung beim Abkühlen hineingerissenen Mikroorganismen abzufangen.

Die Abtötung von Pilzen und Bakterien durch chemische Einflüsse findet bei der Reinigung der bereits mit Mikroorganismen infizierten Geräte und Behälter eine vielfache Anwendung. Besonders wertvoll sind die starken Säuren und Alkalien, die samt und sonders eine große Desinfektionskraft besitzen. Weiters sind von besonderem Wert einige organische Desinfektionsmittel, wie Lysol, Formaldehyd und 75%iger Alkohol. Sämtliche mit Bakterien oder Pilzen verunreinigten Glasgeräte, die nicht sofort im strömenden Dampf sterilisiert werden, sind in eine 3%ige Lysollösung oder in Formaldehyd 1 : 500 (2·5 $cm^3$ Formol auf 500 $cm^3$ Wasser) einzulegen. Wenn sie später gereinigt werden, ist besonders darauf zu achten, daß keine Spur des Desinfektionsmittels zurückbleibt. Dies gilt in erster Linie für die Gläser, Kolben und Proberöhrchen, die später mit Nährsubstraten gefüllt werden. 60—75%iger Äthylalkohol ist ebenfalls ein vorzügliches Desinfektionsmittel und bietet den Vorteil, daß er rasch und spurlos verdunstet. Deshalb gebraucht man ihn besonders zur Sterilisierung von hohlgeschliffenen Objektträgern und feuchten Kammern, die zur mikroskopischen Reinzucht Verwendung finden. Es gibt noch eine ungeheure Menge von Desinfektionsmitteln, die aber vor den genannten keine wesentlichen Vorzüge besitzen.

## II. Nährsubstrate.

### a) Feste Nährsubstrate variabler Zusammensetzung.[1])

Als feste Nährsubstrate dienen vor allem die Kartoffel, die Mohrrübe, die Zuckerrübe, die mehligen Knollen von Helianthus tuberosus L. (Topinambur), Kohlrabi und Selerie. Die Reservestoffbehälter der Pflanzen zeigen in den verschiedenen Jahreszeiten und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen erhebliche Schwankungen ihrer

[1]) *A. Mayer*, Praktikum der botanischen Bakterienkunde. Fischer, Jena 1903. S. 29.

chemischen Zusammensetzung, die übrigens sehr komplizierter Natur ist. Aus diesen Gründen ändern die Pilze und Bakterien ihr Wachstum auf ihnen sehr beträchtlich. Die genannten Körper werden meistens zu Scheiben oder Zylindern verarbeitet, die dann in Glasdosen oder Eprouvetten gebracht und darin sterilisiert werden. Die Reaktion der genannten Nährsubstrate ist durchwegs sauer. Wünscht man eine neutrale Reaktion, so reibt man ihre Oberfläche mit kohlensaurem Kalk vor dem Sterilisieren ein.

Für die Zucht von Bakterien wird am meisten verwendet die Kartoffel. Man sucht sich tadellose Exemplare aus, die nun unter der Wasserleitung mit Seife und Bürste aufs sorgfältigste von den erdigen Bestandteilen gereinigt werden. Hierauf schält man sie dick. Nun schneidet man ca. 5 *mm* dicke Scheiben und sticht diese mit einer Stanze oder einem Korkbohrer von ca. 25—30 *mm* Weite aus. Diese runden Scheiben kommen dann in sterilisierte Glasdosen und werden in drei aufeinanderfolgenden Tagen durch je 25 Minuten im strömenden Dampf erhitzt. Hierauf bringt man sie auf 24 Stunden in den Brutschrank mit 37° C und sieht nach dieser Zeit nach, ob sich etwa Bakterienkolonien entwickelt haben. Infizierte Scheiben werden weggegeben. Die keimfreien Kartoffeln können nun durch längere Zeit hindurch aufgehoben werden, wenn man die Dosen mit Heftpflasterstreifen luftdicht verklebt, um das Austrocknen hintanzuhalten. Die zweite, für viele Zwecke wegen der leichteren unverunreinigten Übertragung der Pilze und Bakterien bessere Art der Kartoffelnährbodenbereitung besteht darin, das Kartoffelfleisch in Form von schräg zerschnittenen Zylindern in Eprouvetten zu sterilisieren. Fig. 357 zeigt uns ein derartiges, mit einem Stück Kartoffel beschicktes Proberöhrchen.

Die Kartoffel wird, wie oben angegeben, behandelt, dann geschält und aus ihr mit einem Korkbohrer Zylinder von ca. 1 *cm* Durchmesser und 3 *cm* Höhe ausgestochen. Diese Kartoffelzylinder werden nun oben und unten platt abgeschnitten und durch einen schrägen Schnitt in zwei symmetrische Teile zerlegt. Jeder Teil kommt mit der schrägen Fläche nach oben sehend in vorher sterilisierte Proberöhrchen, die einen Watteverschluß tragen. Auch hier wird durch 3 Tage je 25 Minuten im Dampftopf sterilisiert, dann in den Brutschrank gegeben und endlich die keimfrei gebliebenen Kartoffelzylinder weiter zur Zucht verwendet. Um bei längerer Aufbewahrung ein Austrocknen zu vermeiden, überzieht man den Watteverschluß mit einer dicht schließenden Kautschukkappe. Dies darf aber erst nach vollständigem Trocknen des Wattebausches geschehen, da sonst die etwa auf die Watte gefallenen Pilzsporen auskeimen, dieselbe durchwachsen und schließlich den Nährboden infizieren und unbrauchbar machen.

Für die Anlegung größerer Versuchsreihen durch längere Zeit hindurch ist es notwendig, wenigstens einen einigermaßen einheitlichen Nährboden zu besitzen. Dies erreicht man dadurch, daß man auf einmal eine

größere Anzahl von Eprouvetten mit Stücken gleich großer Kartoffeln von ein und derselben Sorte beschickt und dann vor dem Sterilisieren Gummikappen[1]), die einen Schlitz besitzen, über die Wattebausche zieht, wie sie in Fig. 358 abgebildet sind, und seinerzeit von *Stutzer* für die Aufbewahrung sterilisierter Milch angegeben wurden. Um einen vollständig dichten Verschluß zu erhalten, schiebt man den Wattebausch vollständig in das Röhrchen hinein. Die rechte Abbildung der Fig. 358 zeigt uns die eben aufgesetzte Verschlußkappe. Durch den bei *a* angebrachten Schlitz kann die Luft beim Sterilisieren im Dampftopf entweichen. Sobald die Erwärmung nachläßt und der entstandene Wasserdampf kondensiert ist, wird durch den Luftdruck der Schlitz vollständig zusammengepreßt und die obere vorspringende Kautschukplatte fest angedrückt. Es kann fernerhin kein Wasserdampf austreten, wodurch jede Austrocknung vermieden ist. Da auch keine Luft einzudringen vermag, ist jede Infektionsmöglichkeit ausgeschlossen. Auf diese Weise gelingt es, wenigstens einigermaßen einheitliche Nährsubstrate für eine größere Versuchsreihe in Vorrat zu haben.

Fig. 357.

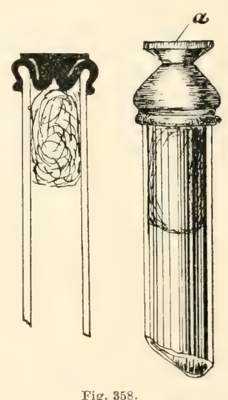


Fig. 358.

Bei der Herstellung von Nährböden aus den übrigen genannten Reservestoffbehältern von Pflanzen verfährt man in gleicher Weise.

Für die Zucht von höheren Pilzen wird von *Brefeld*[2]) Brot empfohlen, das aus Roggen- und Weizenmehl hergestellt wurde. Das gut ausgebackene, nicht gesäuerte Brot wird von der Rinde befreit und in Scheiben zerschnitten einer diskontinuierlichen Sterilisation bei einer Temperatur von 56—60° C unterworfen. Es genügt eine 3—5malige Erwärmung in Zeitintervallen von 2—3 Tagen. Um Austrocknung zu vermeiden, befeuchtet man die Brotschnitten mit Leitungswasser. Brot kann auch als Vehikel für die später zu beschreibenden Nährflüssigkeiten verwendet werden, indem man dasselbe mit diesen vor dem Sterilisieren durchtränkt.

---

[1]) *R. Burri*, Zentralbl. für Bakt. 2. Abt. Bd. 1. S. 627 (1895).

[2]) *O. Brefeld*, Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. Bd. **14**. Die Kultur der Pilze. S. 57. Schöningh, Münster 1908.

## b) Flüssige Nährsubstrate schwankender Zusammensetzung.

### 1. Blutserum.

Für die Zucht einer Reihe von menschen- und tierpathogenen Bakterienarten verwendet man steriles Blutserum verschiedener Tierspezies und des Menschen. Für den gewöhnlichen Laboratoriumsgebrauch hält man keimfreies Rinderblutserum auf Lager. Im Schlachthause gelingt die unmittelbare keimfreie Gewinnung aus der Ader gewöhnlich nicht. Man fängt das ausfließende Blut in hohen, schmalen Standzylindern auf, bringt es sofort an einen kühlen Ort und läßt es gerinnen. Erst nach erfolgter, vollständiger Erstarrung darf man es vom Schlachthaus ins Laboratorium übertragen. Dann löst man den ganzen Blutkuchen mit einem Glasstab von der Glaswand ab und läßt weiter in der Kälte stehen. Sobald sich das Serum abgeschieden und als klare Flüssigkeit über dem Kuchen angesammelt hat, hebert man es in sterileProberöhrchen. Man unterwirft es nun einer diskontinuierlichen Sterilisation bei 58° C, indem man es durch 6 Tage hindurch täglich eine Stunde dieser Temperatur aussetzt. Für diese Sterilisation eignen sich vorzüglich Thermostaten, wie sie *Heim* [1]) in seinem Lehrbuche angibt. Fig. 359 zeigt uns diesen Wärmkasten. Er besteht aus einem mit Asbest bekleideten Blechtopf von 28 *cm* Durchmesser und 30 *cm* Höhe, der zur Hälfte mit Wasser gefüllt wird. In den Topf kommt das „zylinderhutförmige“ Einsatzgefäß, dessen umgebogener Rand zwei Hülsen für ein Thermometer und einen Thermoregulator trägt. Das letztere Gefäß ist 21 *cm* hoch und 20 *cm* breit und besitzt einen mit Bajonettverschluß festgehaltenen Deckel. In das zweite Gefäß wird ein ebenfalls an der Wand durchlochter Einsatz eingestellt, der durch sich kreuzende Querwände in vier Abteilungen zerlegt ist, in die die zu sterilisierenden Proberöhrchen kommen. Passende, auf die Watteverschlüsse der Eprouvetten unmittelbar aufgelegte Bleiplatten halten sie in ihrer Lage fest.



Fig. 359.

Die in der oben angegebenen Weise sterilisierten Blutserumproben kommen nach der letzten Sterilisation auf 24 Stunden in den Thermo-

[1]) *L. Heim*, Lehrbuch der Bakteriologie. S. 70. Enke, Stuttgart 1906.

staten mit 28° C und ebensolange in den mit 37° C. Nur diejenigen Röhrchen werden weiter zu Versuchen verwendet, deren Inhalt trotz der Bebrütung keimfrei blieb.

Die Sterilisation durch Filtration empfiehlt sich aus dem Grunde nicht, weil die dafür nötigen mineralischen Filter verschiedene Eiweißsubstanzen ebenfalls zurückhalten.

## 2. Milch.

Milch wird sehr häufig als bakteriologischer Nährboden verwendet. Die frische Milch wird durch Zentrifugieren entrahmt oder von Haus aus als Magermilch von Molkereien bezogen. Dann füllt man sterile Proberöhrchen oder Kölbchen und sterilisiert sie je 20 Minuten an 5 aufeinanderfolgenden Tagen im Dampfschranke. Hierauf kommen die Proben auf wenigstens 72 Stunden in den Thermostaten mit 32° C. Die auch nach dieser Zeit steril gebliebenen Milchnährböden werden zu den Versuchen verwendet. Beim Sterilisieren erleidet die Milch ziemlich eingreifende Veränderungen, auf die bei der Beurteilung der Züchtungsergebnisse Rücksicht zu nehmen ist.

Für viele bakteriologische Versuche gebraucht man das Milchserum allein als „Molkennährboden“. Die Molke wird folgendermaßen hergestellt: Man erwärmt Magermilch auf 40° C und setzt vorsichtige 1%ige Salzsäure zu, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Hierauf filtriert man und neutralisiert das Filtrat mit sehr verdünnter Natronlauge (Indikator Lackmus). Dann kocht man im Dampftopf durch $^3/_4$ Stunden und filtriert vom etwa entstandenen Niederschlag ab. Die fertige Molke muß in dünner Schicht vollständig klar erscheinen. In dicker Schicht zeigt sie eine leicht grünliche Opaleszenz. Sie wird entweder unmittelbar nach der üblichen Sterilisation als Nährboden verwendet oder mit anderen Stoffen, wie Gelatine, Agar etc. kombiniert zur Anwendung gebracht.

## 3. Fleischbrühe.

Zur Darstellung der Fleischbrühe verwendet man Fleisch von verschiedenen Tieren. Wegen der Billigkeit empfiehlt sich für den gewöhnlichen Laboratoriumsgebrauch die Verwendung von Pferdefleisch. Vom Fett möglichst befreites Pferdefleisch wird fein zerhackt, mit der doppelten Menge Brunnenwasser angerührt und dann durch eine Stunde auf offenem Feuer unter öfterem Umrühren gekocht. Dann stellt man die Brühe auf Eis oder in die Kälte. Nach dem vollständigen Erkalten schöpft man die Fettschicht ab und seiht die Suppe durch ein Seihtuch. Das Fleisch selbst preßt man noch mit einer Presse aus. Für diese Zwecke eignen sich sehr gut die kleinen Spindelpressen, wie eine in der Fig. 360 abgebildet ist. Nun läßt man die Fleischbrühe durch 24 Stunden in der Kälte absitzen und hebert den fast klaren Anteil mit einem Winkelheber ab, dessen in die Flüssigkeit ragender Rohrteil in eine feine Spitze ausgezogen ist. Um

eine möglichst gute Ausbeute und klare Flüssigkeit zu erhalten, spannt man den Heber in ein Stativ und senkt ihn sehr vorsichtig in die Flüssigkeit ein. Die so erhaltene konzentrierte Fleischbrühe verdünnt man auf das Volumen der ursprünglich zugesetzten Wassermenge mit destilliertem Wasser. Für gewöhnlich wird diese, je nach der verwendeten Fleischsorte verschieden sauer reagierende Fleischsuppe nicht ohne besondere Zusätze verwendet. Vielmehr verarbeitet man dieselbe zur sogenannten Nährgelatine, dem Nähragar und der Nährbouillon.

Eine für die gewöhnlichen Züchtungszwecke von Mikroorganismen vollkommen ausreichende Nährbouillon erhält man durch Beigabe von Chlornatrium, Traubenzucker und Pepton in folgendem Verhältnis:

| | | |
|---|---|---|
| Fleischbrühe . . . . . . | 100 | $cm^3$ |
| Pepton. sicc. Witte . . . | 1 | $g$ |
| Traubenzucker . . . . . | 1 | „ |
| Chlornatrium . . . . . | 0·5 | „ |

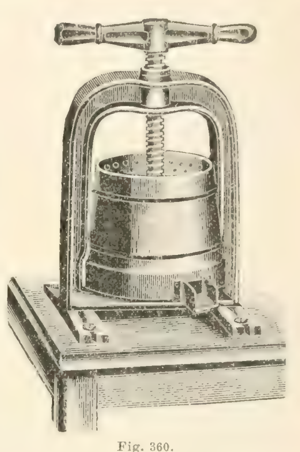


Fig. 360.

Nach dem Auflösen dieser Zusätze in der Wärme neutralisiert man die Mischung durch Zusatz einer 1%igen Natronlauge unter Verwendung von Azolithminlösung als Indikator. Wird die Flüssigkeit alkalisch, so ist entweder sehr verdünnte Phosphorsäure oder Salzsäure vorsichtig bis zur neutralen Reaktion zuzusetzen. Nach dem Neutralisieren wird die Bouillon mit Eieralbumin geklärt. Man stellt sich eine ca. 5%ige Auflösung von trockenem Eieralbumin im Leitungswasser her und fügt auf das obige Quantum 5 $cm^3$ hinzu. Hierauf wird im Dampftopf durch eine halbe Stunde erhitzt und nachher heiß durch ein Faltenfilter in einen sterilen Kolben filtriert.

Für die Herstellung von Nährbouillon kann auch eine Auflösung von Fleischextrakt und Pepton verwendet werden. In diesem Falle ersetzt man die Fleischbrühe durch eine 1%ige Auflösung von *Liebig*schem Fleischextrakt in Wasser und läßt den besonderen Zusatz von Chlornatrium weg.

## 4. Mistdekokt.

Für die Gewinnung und Weiterzüchtung einer großen Anzahl verschiedener Pilze ist eine Pferdemistabkochung sehr zweckmäßig. Nach *Brefeld*[1]) verwendet man die Fäzes von Pferden, die vornehmlich mit

---

[1]) *O. Brefeld*, Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie. Bd. 14. S. 32. Schöningh, Münster (1908).

Hafer gefüttert werden. Diese Fäkalien werden möglichst frisch mit Wasser zu einem Brei angerührt, gekocht und klar abfiltriert. Das in *Erlenmeyer*sche Kölbchen verteilte Filtrat wird noch einer diskontinuierlichen Sterilisation bei 60° C in der für Brot angegebenen Weise (S. 1214) unterworfen. Für den fortwährenden Gebrauch empfiehlt sich die Herstellung eines hochkonzentrierten Dekoktes, indem man das Filtrat auf $^1/_{10}$ des Volumens einengt und im vorher sterilisierten Kölbchen mit Watte- und Kautschukkappenverschluß aufbewahrt (vgl. S. 1214). Vor dem Gebrauche wird mit der entsprechenden Menge destillierten Wassers verdünnt, neuerlich sterilisiert und dann zur Kultur verwendet.

## 5. Würze.

Sowohl gehopfte als auch ungehopfte Bierwürze wird bei Saccharomycetenuntersuchungen als Nährsubstrat benutzt. Es empfiehlt sich, die Bierwürze fertig aus der Brauerei zu beziehen. Sie wird in großen Kolben unter Luftzutritt mit einem Wattebausch verschlossen aufbewahrt. Die kleinen, in Proberöhrchen abgezogenen Portionen werden im strömenden Dampf durch $^3/_4$ Stunden sterilisiert und dann gelüftet. Letzteres erreicht man in einigen Tagen, wenn man die Röhrchen oftmals im Tage umschüttelt, ohne natürlich den Watteverschluß zu benetzen. Läßt man die Proben einfach stehen, so dauert es mindestens 8 Tage, bis eine hinreichende Sauerstoffaufnahme erfolgt ist.

Eine sehr brauchbare Würze („Malzwürze") stellt man sich selbst nach *A. Meyer*[1]) folgendermaßen her: „250 *g* Darrmalz werden geschrotet oder zerstoßen und mit 1 *l* Wasser 1 Stunde bei 60—65° C gehalten. Hierauf koliert man und kocht dann bis zum Ausfällen der Eiweißstoffe gelinde. Man füllt auf 1 *l* auf, filtriert und sterilisiert 20 Minuten im Autoklaven oder an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 20 Minuten im Dampftopfe." Dieser Nährboden kann ohne besondere Durchlüftung sofort zu Zuchtzwecken verwendet werden.

## 6. Hefewasser.

Das Hefewasser, welches zur Züchtung von Gärungsorganismen sehr häufige Verwendung findet, wird in folgender Weise hergestellt[2]): $^1/_2$ *kg* Preßhefe wird mit 2 *l* destilliertem Wasser $^1/_2$ Stunde entweder auf offenem Feuer oder im Dampftopf gekocht. Dabei sind große Kolben oder Gefäße zu verwenden, da der Absud sehr stark schäumt. Noch heiß, filtriert man durch ein Faltenfilter und kocht abermals eine $^1/_2$ Stunde auf offenem Feuer. Hierauf sterilisiert man das Filtrat $^3/_4$ Stunden im strömenden Dampf. Diese konzentrierte Vorratslösung wird vor dem Gebrauche mit dem gleichen Volumen destillierten Wassers verdünnt, in Kölbchen oder

---

[1]) *A. Meyer,* Praktikum der botanischen Bakterienkunde. S. 25. Jena 1903.
[2]) *A. Klöcker,* Die Gärungsorganismen. S. 65. Waag, Stuttgart 1900.

Proberöhrchen abgezogen und nach einer in drei aufeinander folgenden Tagen je 20 Minuten dauernden Sterilisation im strömenden Dampf zur Zucht verwendet.

### 7. Abkochungen von Früchten.

Für verschiedene Pilz- und Bakterienzüchtungsversuche werden Abkochungen der verschiedensten Früchte verwendet. Am häufigsten gebraucht werden solche von Rosinen, Pflaumen und Getreide. Man stellt sie her, indem man die betreffenden Früchte mit der fünf- bis zehnfachen Gewichtsmenge Leitungswasser durch 1 Stunde im strömenden Dampf auskocht und nachher filtriert. Die Sterilisation richtet sich nach der verwendeten Frucht. Auf Bäumen und höheren Sträuchern wachsende Früchte haben an ihrer Oberfläche nur wenig widerstandsfähige Sporen von Pilzen, weshalb man in diesem Falle meistens mit einer einmaligen einstündigen Sterilisation im strömenden Dampf eine volle Keimtötung erreicht. Viel widerstandsfähigere Sporen von Erdbakterien sitzen den Getreidekörnern an, so daß man sterile Getreideabkochungen nur nach mehrmaligem Sterilisieren im strömenden Dampf erhält. In diesen Fällen ist die Verwendung des Autoklaven am Platze.

### 8. Heuinfus.

Dieses wird nach *Arthur Meyer*[1]) folgendermaßen hergestellt: „100 *g* gutes trockenes Wiesenheu werden mit 5 *l* Wasser übergossen, einige Stunden stehen gelassen, 10—15 Minuten gekocht, abfiltriert, mit Soda genau neutralisiert (Lackmuspapier). Nach dem Neutralisieren wird das Infusum in dem mit Watte geschlossenen sterilen Kolben 30 Minuten im Dampftopfe stehen gelassen. Nach 2 Tagen filtriert man, füllt in 200 $cm^3$-Kolben um und sterilisiert im Autoklaven 30 Minuten oder in drei hintereinander folgenden Tagen je 20 Minuten im Dampftopfe.“ Auch von anderen Pflanzen oder Pflanzenteilen wird auf die gleiche Weise das entsprechende Infus hergestellt.

## c) Flüssige Nährsubstrate von konstanter chemischer Zusammensetzung.

So wertvoll die oben genannten flüssigen Nährsubstrate für die Gewinnung und Weiterzüchtung von Mikroorganismen im Laboratorium sind, so haftet ihnen doch der Mangel der Konstanz ihrer chemischen Zusammensetzung an. Für die Erkennung der feineren Lebensvorgänge und für die exakte Wiederbestimmung von neu eingefangenen Mikroorganismen sind sie daher minderwertig. Seit man die Grundbedingungen für den Lebensunterhalt der Bakterien- und Pilzflora näher zu untersuchen unternahm und dabei auf immer einfachere Zusammensetzungen der un-

---

[1]) *A. Meyer,* Praktikum der botanischen Bakterienkunde. S. 26. Jena 1903.

bedingt notwendigen Nahrungsbestandteile stieß, ist man bestrebt, Nährsubstrate von möglichst einfacher Form und Zusammensetzung für die einzelnen Mikroorganismenarten ausfindig zu machen. Im folgenden sind einige Grundtypen von solchen Nährlösungen kontrollierbarer und jederzeit konstanter Zusammensetzung aufgeführt, die natürlich einen ungeheuren Spielraum für Substitutionsversuche durch andere Körper offen lassen und zu solchen Versuchen geradezu herausfordern.

Für die Herstellung der verschiedensten Nährlösungen dieser Gruppe von Nährsubstraten verwenden wir folgende Stammlösungen, die wir in mit Kalilauge und konzentrierter Salzsäure gut gereinigten und nach dem Spülen mit destilliertem Wasser mit hochschmelzendem Paraffin ausgegossenen Gläsern aus Jenaer Normalglas aufbewahren. Bekanntlich lösen sich die verschiedenen Glassorten in verschiedener Menge im Wasser auf. Wenn auch die Menge gelöster Glasbestandteile im allgemeinen klein ist, so können dadurch bei Züchtungsversuchen doch wesentliche Fehler bedingt sein, da beispielsweise Bakterien in bezug auf die Nahrungsmenge äußerst anspruchslos sind. Für die Lösungen zu den gewöhnlichen Laboratoriumsversuchen verwenden wir destilliertes Wasser, das natürlich auch nicht besonders rein und auch durch organische Substanzen verunreinigt ist. Handelt es sich aber um äußerst subtile biologisch-chemische Versuche, dann muß zur Lösung der absolut reinen Chemikalien ein für diesen Zweck besonders sorgfältig gewonnenes destilliertes Wasser benutzt werden. *O. Richter*[1]) stellt sich für solche Zwecke sein destilliertes Wasser auf folgende Weise her: Destilliert wird aus einem Jenaer Kolben durch einen Platinkühler in ein Kölbchen aus Jenaer Glas, das mit Paraffin *Merck* von 78° Schmelzpunkt ausgekleidet worden war. Aufbewahrt wurde das so gewonnene Destillat ebenfalls in einem mit Paraffin ausgekleideten 2 *l*-Erlenmeyerkolben, der mit einem Bausch feinster und reinster Watte verschlossen ist. Dazu ist noch zu bemerken, daß selbst so gewonnenes Wasser nur sehr kurze Zeit völlig einwandfrei bleibt, wenn nicht besondere Vorkehrungen bei der Aufbewahrung getroffen werden. Im Arbeitsraum eines Laboratoriums nimmt es sofort aus der Luft Verunreinigungen auf.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Stammlösung | I: | 10%ige | Lösung | von | $KH_2PO_4$ |
| " | II: | 1%ige | " | " | $CaCl_2$ |
| " | III: | 1%ige | " | " | $MgSO_4 + 7\ H_2O$ |
| " | IV: | 1%ige | " | " | $NaCl$ |
| " | V: | 1%ige | " | " | $Fe_2Cl_6$. |

Aus diesen Stammlösungen wird die sogenannte mineralische Nährlösung (M-Nährlösung *A. Meyers*[1]) hergestellt durch Zusammenschütten von:

[1]) *Oskar Richter*, Zur Physiologie der Diatomeen. Sitzungsber. d. kais. Akad. Wien. Math.-naturw. Kl. Bd. **115**. S. 27. Abt. 1 (1906).

[1]) *Artur Meyer*, Praktikum der botanischen Bakterienkunde. S. 25. Jena 1903.

$10\,cm^3$ I + $10\,cm^3$ II + $30\,cm^3$ III + $10\,cm^3$ IV + $1\,cm^3$ V + $939\,cm^3$ $H_2O$, was im Liter entspricht einem Gehalt von:
$1\,g$ $KH_2PO_4$, $0{\cdot}1\,g$ $CaCl_2$, $0{\cdot}3\,g$ $MgSO_4 + 7\,H_2O$, $0{\cdot}1\,g$ $NaCl$, $0{\cdot}01\,g$ $Fe_2Cl_6$.

Von dieser M-Nährlösung ausgehend, werden durch Zusatz von bestimmten Kohlenstoff- und Stickstoffquellen die verschiedenen Nährsubstrate hergestellt, die dann vor dem Gebrauch einer sehr vorsichtigen Sterilisation unterworfen werden, entsprechend der leichteren oder schwereren Veränderlichkeit der zugesetzten C- und N-Quellen.

Als Stickstoffquellen finden vorwiegend Verwendung Harnstoff, Leucin, Amidobernsteinsäureamid (Asparagin), Acetamid, Methylamin und eine Reihe von verschiedenen Ammonsalzen und salpetersauren Salzen. Man fügt sie in einer Menge von 0·1—1% zur obgenannten mineralischen Nährlösung.

Als Kohlenstoffquellen dienen die verschiedensten Zuckerarten, mehrwertige Alkohole, Äthylalkohol, organische Säuren etc. außer den Kohlenstoff enthaltenden, bereits genannten Stickstoffquellen. Die dargereichte Menge wird mit 0·5—3% bemessen. Von Monosacchariden finden vornehmlich Verwendung Dextrose, Galaktose, von Polysacchariden, Saccharose, Maltose, Milchzucker, von mehrwertigen Alkoholen, Glyzerin, Mannit, Dulzit, von organischen Säuren hauptsächlich Zitronsäure, Weinsäure, Äthylidenmilchsäure, Oxybernsteinsäure, wobei aber gleich bemerkt sei, daß die obenstehende Zusammenstellung durchaus keinen Anspruch auf Vollständigkeit macht.

Mit der mineralischen Nährlösung werden sehr oft als kombinierte Kohlen-Stickstoffquellen Peptone und Albumosen dargereicht, wodurch natürlich wieder Komponenten eingeführt werden, die eine nicht genau kontrollierbare und mehr oder minder unbestimmte chemische Zusammensetzung aufweisen.

### d) Gallertige Nährsubstrate.

#### 1. Nährgelatine.

Man nimmt $1000\,cm^3$ der auf S. 1216 beschriebenen Fleischbrühe, fügt hinzu $10\,g$ Pepton sicc. Witte, $5\,g$ Natriumchlorid, $10\,g$ Traubenzucker und $100\,g$ feinste, sogenannte weiße Gelatine und erwärmt im Dampftopf bis zur vollständigen Lösung der Gelatine. Man mache es sich überhaupt zur Regel, Gelatinenährböden nur so lange zu erhitzen, als es unumgänglich notwendig ist, da die Gelatine sehr leicht an Erstarrungsvermögen einbüßt oder dasselbe vollständig verliert. Nunmehr versetzt man mit einer 1%igen NaOH-Lösung sehr vorsichtig die Nährgelatine bis zur leicht alkalischen Reaktion. Empfindliches Lackmuspapier muß eben leicht blau werden. Zweckmäßiger ist es, kleine Proben mit Azolithminlösung zu versetzen und so die Reaktion fortlaufend zu prüfen. Nun erhitzt man durch 20 Minuten im strömenden Dampf und prüft neuerlich die Reaktion. Wurde sie sauer, wird wieder mit Natronlauge bis zur eben alkalischen Reaktion versetzt. Hierauf kühlt man bis auf

50° C ab und klärt mit Eieralbumin. Entweder fügt man das Weiße eines Hühnereies hinzu oder 20 *cm*³ einer dicken Auflösung von trockenem Eieralbumin in Leitungswasser. Hierauf erhitzt man wieder durch 45 Minuten im Dampftopf und filtriert in der Wärme durch ein angefeuchtetes Faltenfilter. Bei der Verwendung des eingangs beschriebenen Dampftopfes stellt man den beschickten Trichter samt dem Kolben während des Filtrierens in den geheizten, aber geöffneten Dampfschrank. Die vollständig klare Nährgelatine wird nun entweder sofort in Proberöhrchen abgezogen, die man ca. 5 *cm* hoch füllt oder in kleinere sterile Kölbchen abgefüllt, die über dem Watteverschluß noch die auf S. 1214 beschriebene Kautschukkappe bekommen. Hierauf sterilisiert man an drei hintereinander folgenden Tagen im Dampftopfe je 20 Minuten. In der Zwischenzeit hält man den Nährboden bei Zimmertemperatur. Die in Eprouvetten ausgefüllten Gelatineportionen läßt man entweder in den senkrecht aufgestellten Röhrchen erstarren oder aber in schräger Stellung, entsprechend der Verwendung zu Stichkulturen bzw. Plattenkulturen oder Strichkulturen.

An Stelle der Fleischbrühe kann zur Herstellung der Nährgelatine auch Fleischextrakt verwendet werden. In diesem Falle nimmt man auf 1000 *cm*³ Nährsubstrat 10 *g* Fleischextrakt und kann den Kochsalzzusatz streichen.

Für besondere Zwecke kann Gelatine in Verbindung mit den früher angegebenen Abkochungen ebenfalls zu sehr brauchbaren Nährsubstraten gallertiger Natur verarbeitet werden, sofern diese Dekokte keine zu stark saure oder alkalische Reaktion aufweisen, da besonders in letzterem Falle das Erstarrungsvermögen der Gelatine rasch sinkt oder vollends verloren geht. Daher ist eine Titration derselben sehr zu empfehlen. Eine Alkaleszenz von ca. 6°/₀ Normalalkali ist für eine 10°/₀ige Gelatinelösung wohl die oberste Grenze.

## 2. Nähragar.

Der aus verschiedenen Florideen der Gattung Gelidium, Gracillaria etc. hergestellte Agar-Agar wird am besten nicht unmittelbar zur Herstellung des Nähragars verwendet, sondern vorher einem Fäulnisprozeß unterworfen, wie schon *Beijerinck* richtig angibt. Die fadenförmige oder zylindrische Droge wird in sehr kleine Stückchen mit einer Schere zerschnitten, in einem größeren Filtrierstutzen in Portionen von 15 *g* mit Leitungswasser übergossen und durch 8 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Bei der nun einsetzenden Fäulnis wird der größte Teil der stickstoffhaltigen Verbindungen zersetzt und beim späteren Auswaschen in fließendem Leitungswasser entfernt. Dabei gehen auch alle Verunreinigungen und löslichen Bestandteile heraus. Das Waschen wird mindestens durch 8 Tage fortgesetzt und kann beliebig länger dauern. Verfasser läßt ständig einige ausgefaulte Portionen in einem Sieb unter der Wasserleitung stehen.

Eine solche gut gewässerte Menge (15 *g* ursprüngliches Trockengewicht) wird nun durch Abtropfen und leichtes Abpressen in einem Tuche

vom überschüssigen Wasser befreit, in einem Topf mit 800 $cm^3$ Fleischbrühe übergossen und im Dampftopf bis zur kompletten Lösung erhitzt. Während dieser Zeit löst man 10 *g* Pepton, 5 *g* Natriumchlorid, 10 *g* Traubenzucker in 100 $cm^3$ Fleischbrühe und fügt noch 10 $cm^3$ Glyzerin hinzu. Nach dem Auflösen des Agars fügt man die letztgenannte Portion hinzu und prüft nunmehr die Reaktion mit Lackmuspapier oder Azolithminlösung. Man setzt solange 1%ige NaOH-Lösung zu, bis eine geringe, aber deutliche Bläuung des Indikators auftritt. Jetzt erhitzt man nochmals durch $^1/_4$ Stunde, prüft abermals die Reaktion und korrigiert sie eventuell durch weiteren vorsichtigen Zusatz von Natronlauge. Nunmehr kühlt man den Agar auf 60° ab, setzt das Weiße eines Hühnereies oder 20 $cm^3$ einer dicken Albuminlösung zu und erhitzt durch 1 Stunde im Dampftopf. Hierauf wird im Dampftopf durch ein vorgewärmtes, mit Wasser benetztes Faltenfilter filtriert. Agarnährböden gehen viel schwieriger durchs Filter als Gelatine. Es empfiehlt sich deshalb, den Nährboden zum Filtrieren auf eine größere Anzahl kleiner Filter zu bringen. Die weitere Behandlung deckt sich mit der für Nährgelatine beschriebenen.

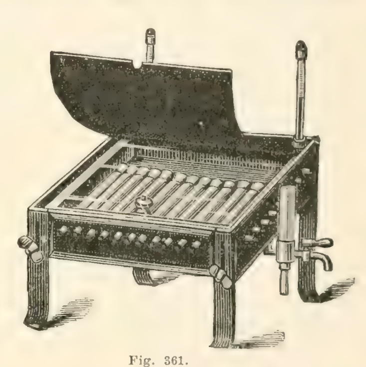


Fig. 361.

Zur Herstellung von sauren Nährsubstraten eignet sich Agar ganz und gar nicht, da schon durch sehr geringe Mengen von freier Säure das Erstarrungsvermögen desselben wesentlich beeinträchtigt wird.

Zu den gallertigen Nährsubstraten gehört auch das schief erstarrte Blutserum. Zur Herstellung dieses Nährsubstrates wird das auf S. 1215 beschriebene sterile Blutserum verwendet. Die Röhrchen mit dem flüssigen sterilen Blutserum kommen in schräger Stellung in einen Heizschrank, dessen Temperatur konstant auf 69° C stehen bleibt und verbleiben darin in dieser Lage bis zum völligen Erstarren des Inhaltes. Um Austrocknung zu vermeiden, überdeckt man die Wattebäusche noch mit Kautschukkappen. Sehr zweckmäßig erweisen sich dafür die eigens hierzu konstruierten „Apparate zum Erstarren von Blutserum“, wie einen Fig. 361 zeigt. Durch Verstellung der vorderen Füße des Schrankes kann eine beliebige Neigung der Röhrchen herbeigeführt werden.

### e) Nährsubstrate für die Gewinnung und Zucht bestimmter Mikroorganismen.

Entsprechend den Erfahrungen über die Lebensweise von Pilzen und Bakterien in natürlichen Lebensbedingungen sucht man bei der künstlichen

Zucht derselben ihnen dadurch möglichst nahe zu kommen, daß man ähnliche Verhältnisse schafft, wie sie natürlich herrschen. Dies kann selbstredend nur bis zu einem gewissen Grade geschehen, da die Bakterien einmal nur in den seltensten Fällen natürlich in Reinkulturen vorkommen, anderseits eine Reihe der verschiedensten Nebenumstände herrschen, die entweder überhaupt noch nicht gewürdigt sind oder aber nicht nachgeahmt werden können. Trotzdem gelingt es, durch Einhaltung besonderer Vorsichtsmaßregeln und Darreichung geeigneter Nährstoffkombinationen den natürlichen Verhältnissen nahe zu kommen und so bestimmte Bakterienarten und Pilzarten in reicherer Ausbeute zu gewinnen. Wohl die meisten derartigen Versuche betreffen die pathogenen Bakterien, für deren Zucht und Gewinnung die Methoden im VIII. Abschnitt aufgeführt sind. Es würde zu weit führen, die vielen Methoden zur Züchtung bestimmter Mikroorganismen aufzuzählen, die im Laufe der Zeit auftauchten und bald wieder verschwanden. Immerhin sollen einige davon Erwähnung finden, die sich wenigstens einigermaßen als brauchbar erwiesen.

Bei den für die Gewinnung und Weiterzüchtung der im Kreislauf des Stickstoffes in der Natur eine Rolle spielenden Mikroorganismen sind für einige Arten derselben besondere Nährsubstrate unbedingt nötig, die im folgenden kurz beschrieben werden sollen.

Nährlösung für stickstoffbindende Bakterienarten (Clostridium Pastorianum) nach *Winogradsky*[1]):

$K_2HPO_4$ 0·1 *g*, $MgSO_4 + 7H_2O$ 0·05 *g*, NaCl, $FeSO_4$ und $MnSO_4$ in geringeren Quantitäten (0·001—0·002 *g*), etwas gepulvertes $CaCO_3$, Dextrose 2—4 *g*, destilliertes Wasser 100 *cm*³.

Nach *Beijerinck*[2]) für Azotobacter chroococcum: Agar (2% in destilliertem Wasser) mit einem Gehalt von 2% Mannit und 0·02% $K_2HPO_4$.

Nährboden für die Zucht von Knöllchenbakterien der Leguminosen nach *Beijerinck*[3]): Eine Abkochung von Papilionaceenblättern wird mit 7% Gelatine, 0·25% Asparagin und 0·5% Rohrzucker versetzt und so weit sauer belassen, daß die Säuremenge in 100 *cm*³ des fertigen Nährsubstrates 0·6 Normalsäure betrug.

Für die Reinzüchtung von Harnstoff vergärenden Mikroorganismen dienen die gewöhnlichen Nährsubstrate (Nährgelatine, Nährbouillon etc.) mit einem Zusatz von 0·1—2% Harnstoff. Die Reaktion soll deutlich alkalisch sein.

Für die Züchtung der nitrifizierenden Bakterien verwendet *Winogradsky*[4]) folgende Nährlösung:

---

[1]) *S. Winogradsky*, Arch. des Sciences biolog. publ. par l'Instit. imp. de Méd. expér. à St. Pétersbourg. T. **3**. p. 297 (1895).

[2]) *M. Beijerinck*, Über oligonitrophile Mikroben. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **7**. S. 574 (1901).

[3]) *M. Beijerinck*, Die Bakterien der Papilionaceenknöllchen. Botanische Zeitung. Bd. **46**. S. 744 (1888).

[4]) *S. Winogradsky*, Nitrifikation. *Lafars* Handbuch der techn. Mykologie. Bd. **3**. S. 146. Fischer, Jena (1904).

*a)* Ammoniumsulfat 1 *g*, Kaliumphosphat 1 *g*, Brunnenwasser 100 $cm^3$, basisch-kohlensaure Magnesia im Überschuß.

*b)* Ammoniumsulfat 2—2·5 *g*, Kaliumphosphat 1 *g*, Magnesiumsulfat 0·5 *g*, Chlorcalcium Spuren, destilliertes Wasser 1000 $cm^3$, basisch-kohlensaure Magnesia im Überschuß.

*c)* Ammoniumsulfat 2 *g*, Kaliumphosphat 1 *g*, Magnesiumsulfat 0·5 *g*, Chlornatrium 2 *g*, Eisenoxydul 0·4 *g*, destilliertes Wasser 1000 $cm^3$, basisch-kohlensaure Magnesia im Überschuß.

Zur Vermeidung von Verlusten an Ammoniak setzt man das Ammonsulfat erst nach dem Sterilisieren zu, indem man die entsprechende Menge einer sterilisierten 10%igen Stammlösung dieses Salzes unmittelbar vor dem Gebrauche des Nährsubstrates hinzufügt.

Die Bereitung eines gallertigen Nährbodens zur Züchtung des Nitritbildners erfolgt nach *Winogradsky*[1]) auf folgende Weise.

Man stellt sich die lösliche Kieselsäure durch Einbringen von Salzsäure (spez. Gew. 1·10) in das gleiche Volumen von Wasserglas-Natron oder -Kali (spez. Gew. 1·05—1·06) her. Das Gemisch wird in geprüften Pergamentschläuchen der Dialyse gegen schnell fließendes Leitungswasser ausgesetzt. Man nehme in dünnen Schläuchen kleine Portionen, die in einem Tage dialysiert sind. Hierauf dialysiert man noch 1 Tag gegen 3—4mal gewechseltes destilliertes Wasser. So bekommt man eine ca. 3 Monate haltbare, vollständig klare Auflösung von ungefähr 2% Kieselsäure, die ohne Schaden bei 120° C sterilisiert werden kann. Zur Darstellung des festen Nährbodens braucht man noch folgende Lösungen:

1. Ammonsulfat 3 *g*, Kaliumphosphat 1 *g*, Magnesiumsulfat 0·5 *g*, destilliertes Wasser 100 *g*.
2. Eisenvitriol 2 *g* in 100 $cm^3$ destilliertem Wasser.
3. Konzentrierte Lösung von Chlornatrium in destilliertem Wasser.
4. Magnesiamilch, eine Aufschwemmung von gesiebter kohlensaurer Magnesia in destilliertem Wasser.

Vor dem Gebrauche mischt man 50 $cm^3$ der obigen Kieselsäurelösung mit 2·5 $cm^3$ der Lösung 1 und 1 $cm^3$ der Lösung 2 und soviel von der Magnesiamilch, daß das Gemisch milchig getrübt ist. Dann gießt man die Mischung in *Petri*sche Schalen (siehe S. 1230) aus und setzt der fertigen Platte ein kleines Tröpfchen der Lösung 3 zu. Nach ungefähr 1 Stunde ist die Platte erstarrt und wird weiter verimpft.

Magnesiagipsplatten von *Omelianski*[2]) zur Zucht der Nitritbildner. Man fertigt ein Gemenge von Gips 99 zu kohlensaurer Magnesia 1 und setzt unter ständigem Umrühren soviel Wasser zu, bis ein dicker Brei entsteht. Dieser wird auf einer Spiegelglasplatte ausgebreitet und oberflächlich geglättet. Sobald die Masse etwas erstarrt ist, schneidet man

---

[1]) *S. Winogradsky*, Nitrifikation. *Lafars* Handbuch der techn. Mykologie. Bd. 3. S. 155. Fischer, Jena (1904).

[2]) *W. Omelianski*, Magnesiagipsplatten als neues festes Substrat für die Kultur der Nitrifikationsorganismen. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 5. S. 652 (1899).

runde Platten aus, die in *Petri*sche Schalen passen, oder Streifen, die in Reagenzgläser kommen. Nach dem vollständigen Erhärten werden die Platten in die entsprechenden Schalen gegeben und soviel von der auf S. 1225 angegebenen Nährlösung C von *Winogradsky* eingegossen, daß ihr Niveau ungefähr in die halbe Scheibenhöhe zu liegen kommt. In Fig. 362 ist die Anordnung im Querschnitt wiedergegeben. Bei den Reagenzglaskulturen tauchen die eingelegten Magnesiagipsstreifen ungefähr $^1/_4$ in die obgenannte Nährflüssigkeit ein. Hierauf wird der Nährboden im Autoklaven bei 120° C durch 20 Minuten sterilisiert.

Für die Zucht von Nitratbildnern verwendet *Winogradskg*[1]) folgende Nährsubstrate:

*a)* Nährlösung: Natriumnitrit (Natr. nitros. puriss. Merck) 1·0 *g*, Kaliumphosphat 0·5 *g*, Magnesiumsulfat 0·3 *g*, Soda (wasserfrei) 1·0 *g*, Natriumchlorid 0·5 *g*, Ferrosulfat 0·4 *g*, destilliertes Wasser 1000 *cm*³.

*b)* Nitritagar: Natriumnitrit 2 *g*, Natriumkarbonat (wasserfrei) 1 *g*, Kaliumphosphat Messerspitze, Agar 15 *g*, Flußwasser 1000 *cm*³.

*Omelianski*[2]) züchtet die Erreger der Wasserstoffgärung der Zellulose in folgender Nährlösung: Phosphorsaures Kali 1 *g*, Magnesiumsulfat 0·5 *g*, schwefelsaures oder phosphorsaures Ammoniak 1 *g*, Natriumchlorid Spur, destilliertes Wasser 1000 *cm*³ und Zusatz von Kreide. Für die Zucht der Erreger der Methangärung der Zellulose dient die gleiche Nährlösung mit 0·1% Ammonphosphat ohne Ammonsulfat.

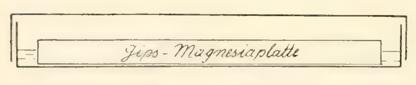



Fig. 362.

Nach *Molisch*[3]) eignen sich folgende Agarnährböden für Purpurbakterien: 1000 *g* Wasser, 0·5 *g* $MgSO_4$, 0·5 *g* $K_2HPO_4$, Spur $FeSO_4$, 10 *g* Pepton, 18 *g* Agar oder 1000 *g* Fluß-(Moldau)wasser, 18 *g* Agar, 5 *g* Pepton, 5 *g* Dextrin oder Glyzerin.

Für die Zucht der im Meere lebenden Mikroorganismen verwendet man die üblichen Nährsubstrate, nur mit dem Unterschiede, daß man an Stelle des Zusatzes von 0·5% Natriumchlorid das im Handel erhältliche „Meersalz" in einer Menge von 3·2% hineingibt. Schon der auf 3% erhöhte Kochsalzzusatz wird in den meisten Fällen ausreichen.

## ANHANG.

Anhangsweise seien hier noch einige Apparate erwähnt, die zum Abfüllen von Kultursubstraten in bestimmten Mengen dienen und zur Aufbewahrung und Entnahme von sterilem Wasser bestimmt sind, das bei

[1]) *S. Winogradsky,* Die Nitrifikation. *Lafars* Handbuch der techn. Mykologie. Bd. 3. S. 170. Fischer, Jena (1904).

[2]) *W. Omelianski,* Die Zellulosegärung. *Lafars* Handbuch der techn. Mykologie. Bd. 3. S. 252. Fischer, Jena (1905).

[3]) *H. Molisch,* Die Purpurbakterien. S. 11. Fischer, Jena (1907).

bakteriologischen und besonders mykologischen Arbeiten ständig zur Stelle sein soll.

Als **Abfüllvorrichtung**[1]) für Nährsubstrate dient folgender Apparat, den Fig. 363 uns im Bilde zeigt. Er besteht aus einer Bürette und dem Vorratsgefäß mit der auszufüllenden Nährflüssigkeit, das bei sterilem Abzapfen des Inhaltes mit einem Wattefilter zu versehen ist, damit die beim Ablassen des Nährstoffes in die Bürette eintretende Luft keine Mikroorganismen mitreißen kann. Die Bürette selbst ist oben ebenfalls mit einem Wattebausch verschlossen. Besonders dann, wenn die abgefüllten Nährsubstrate noch einer Sterilisation unterworfen werden,

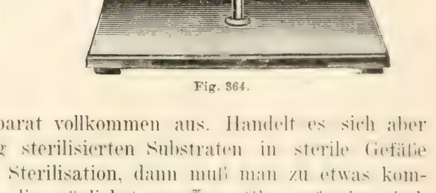


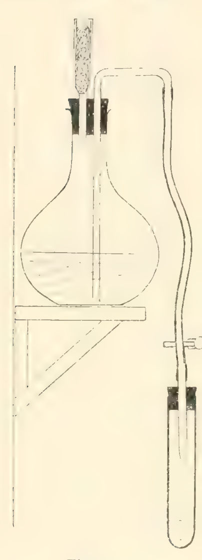
Fig. 363. Fig. 364.

kommt man mit diesem Apparat vollkommen aus. Handelt es sich aber um die Abfüllung von fertig sterilisierten Substraten in sterile Gefäße ohne nachfolgende neuerliche Sterilisation, dann muß man zu etwas komplizierteren Apparaten greifen, die möglichst ganz aus Glas gefertigt sind.

[1]) *J. Kuprianow,* Zur Methodik der keimfreien Gewinnung des Blutserums. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. **15**. S. 458 (1894).

Unsere Fig. 364 zeigt uns eine solche Abfüllvorrichtung nach *Orlowski* mit *Maassen*schen Glashähnen, die eine Infektion beim Abfüllen sicher hintanhalten. Die kleine Bürette muß oben noch mit einem Wattefilter versehen werden, damit beim Ablassen der Nährflüssigkeit keine Infektion statthaben kann.

Als Behälter für steriles Wasser dient eine sehr einfache Vorrichtung, wie sie *A. Klöcker*[1]) beschreibt. Sie besteht aus einem großen Kolben mit doppelt durchbohrtem Stopfen, dessen eine Bohrung ein Wattefilter trägt, bestehend aus einem mit Watte gefüllten Glasrohr, über das eine Glaskappe gestülpt ist. Durch die andere Bohrung geht ein Glasrohr bis zum Boden des Gefäßes. Das Rohr ist doppelt gebogen und trägt einen Kautschukschlauch, an den ein in eine Spitze ausgezogenes Röhrchen angeschlossen ist. Fig. 365 zeigt die ganze Einrichtung auf einer Wandkonsole aufgestellt. Man sterilisiert den Inhalt samt dem Behälter und Ausflußrohr. Nach Entfernung des Wattefilters wird die Bohrung für letzteres mit einem Glasstäbchen verschlossen, das lange Rohr soweit herausgezogen, bis sein Ende über der Flüssigkeit steht und nun auf dem Sandbade der Inhalt zum Sieden erhitzt. Man läßt einige Zeit den Dampf durch den Kautschukschlauch streichen und durch das zugespitzte Rohr ausströmen. Nach 1stündigem Kochen entfernt man den Kolben vom Sandbade, der Glasstab wird entfernt und an seine Stelle das im Heißluftschrank sterilisierte Filter eingesetzt, das lange Rohr bis knapp an den Gefäßboden geschoben und an den Kautschukschlauch ein Quetschhahn gelegt. Hierauf wird neuerlich erhitzt, dann der Quetschhahn geöffnet, Wasser ausfließen gelassen und dann der Hahn geschlossen. Dann wird vom Feuer weggenommen. Um eine sterile Ausflußöffnung zu erhalten, steckt man über das Auslaufröhrchen einen Kork, der in ein kleines Gefäß paßt, das etwas Alkohol enthält, oder ein mit Formol getränktes Wattestückchen. Vor der Entnahme zum Versuch läßt man etwas Wasser ablaufen, um den Alkohol bzw. das Formol wegzuspülen.


Fig. 365.

## III. Reinzuchtmethoden.

Vor der Beschreibung der einzelnen Reinzuchtmethoden seien jene Gerätschaften beschrieben, die beim Reinzüchten und Weiterkultivieren von Bakterien und Pilzen immer benutzt werden.

[1]) *Alb. Klöcker,* Die Gärungsorganismen. S. 55. Waag, Stuttgart (1900).

Sämtliche Kulturgefäße, Proberöhrchen sowohl als auch Kölbchen und Schalen, sind vor dem Gebrauch in Papier eingewickelt im Heißluftsterilisator (S. 1205) in der angegebenen Weise zu sterilisieren. Eprouvetten und Kölbchen werden zuvor mit einem Watteverschluß versehen, der so eingefügt wird, daß kein Kanal im Bausche oder an der Berührungsfläche von Watte und Glas entsteht. Deshalb sind die Bäusche möglichst fest herzustellen.

Alle Impfungen von Nährsubstraten mit Bakterien werden mittelst Platinnadeln oder Platinösen ausgeführt oder mit unmittelbar vor dem Gebrauch hergestellten Glasnadeln. Die Platinnadeln hält man sich in mehreren Sorten, am besten in 25 *cm* lange Glasstäbe unter Zwischenschaltung eines Stückes leicht schmelzbaren Glases eingeschmolzen vorrätig.

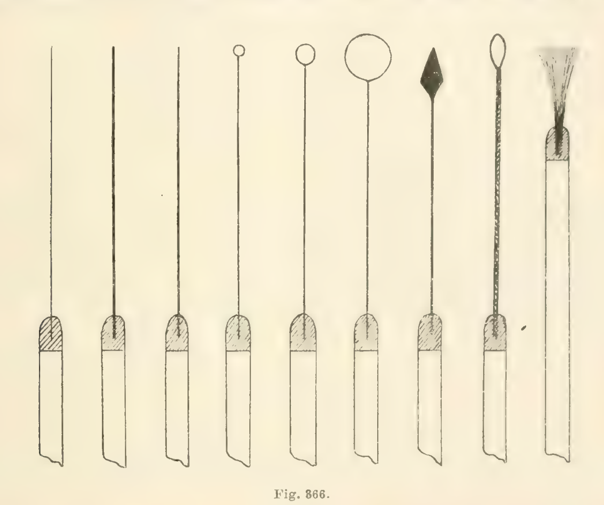


Fig. 366.

Die Nadeln sind 6—8 *cm* lang und 0·2—0·5 *mm* dick. Außerdem gebraucht man sehr oft eine Nadel aus Platiniridium, die ebenfalls in der angegebenen Weise in einen Glasstab eingeschmolzen wird. Außer den Nadeln hat man vorrätig mindestens 3 Ösen aus Platin mit einem Durchmesser von 2, 4 und 8 *mm* und einen Pinsel aus feinstem Platindraht von 1·5 *cm* Länge, ebenfalls in Glas eingeschmolzen. In Fig. 366 sind diese Gerätschaften abgebildet. Für die Übertragung von schwierig abnehmbaren Kulturbelägen kann man sich noch einer Lanzettnadel aus Platin und einer Öse aus dickerem zusammengedrehten Platindraht bedienen.

Jede Abimpfung oder Übertragung von Mikroorganismen in Proberöhrchenkulturen von einem Nährsubstrat auf ein anderes geschieht in folgender Weise: Zwischen den Daumen und Zeigefinger der linken ge-

streckten Hand wird das Röhrchen mit sterilem Inhalt und dasjenige mit der Kultur in möglichst schräger Lage genommen, nachdem die Wattebäusche kurz abgeflammt wurden. Hierauf glüht man die Impfnadel oder -öse in der Flamme aus und zieht das untere Drittel des Glasstabes, an dem die Nadel sitzt, 15mal unter Drehen durch die Flamme. Nunmehr faßt man, ohne die Nadel aus der Hand zu geben oder irgendwo anzukommen, den Wattebausch des einen Rohres, zieht ihn heraus und legt ihn mit der berußten Seite zwischen Zeige- und Mittelfinger der linken Hand so, daß die ins Gläschen ragende Seite von jeder Berührung frei bleibt und auf der Handrückenseite hervorragt. Der Wattebausch des zweiten Röhrchens wird ebenso zwischen den dritten und vierten Finger eingeklemmt. Hierauf führt man die ausgeglühte Nadel, ohne etwa den Röhrchenrand oder im Innern die Glaswand berührend, bis zur Kultur ein, benetzt die Nadelspitze bzw. taucht bei flüssigen Kulturen die Öse ein und führt sie sofort ohne jede Berührung wieder heraus und ebenso in das sterile Röhrchen ein. Nun streicht man das Impfmateriale im neuen Nährboden ab und fährt wieder ohne Berührung der Wände heraus. Hierauf setzt man die Wattebäusche sofort in die Röhrchen und glüht das Impfgerät sogleich in der Flamme aus.

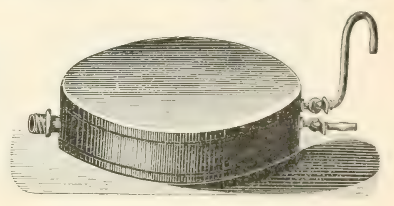
In gelatinösen Nährsubstraten, die in senkrecht gestellten Röhrchen erstarrt sind, legt man durch Einstechen der mit dem Bakterienmaterial benetzten Nadel sogenannte „Stichkulturen“ an. Sind diese Nährsubstrate schräg erstarrt oder zu Platten in Schalen verarbeitet, führt man darauf Striche aus. Letztere Zuchten bezeichnet man als Strichkulturen. Verimpft man die Bakterien in verflüssigte gelatinöse Nährsubstrate, verteilt sie dann durch Schütteln und läßt in der Kälte im Röhrchen den beimpften Nährboden wieder erstarren, so spricht man von Schüttelkulturen.

### 1. Das Gelatine-Plattenverfahren.

Bei diesem Verfahren gebraucht man die auf S. 1221 angegebene Nährgelatine als Nährsubstrat und sterilisierte Doppelschalen (Petrischalen). Letztere werden im Heißluftsterilisator bei 155—160° C durch eine Stunde sterilisiert.

Man verflüssigt die in Proberöhrchen befindliche Nährgelatine und kühlt sie dann auf 33° C ab. Nunmehr bringt man in das erste Röhrchen soviel von dem zu untersuchenden bakterienhaltigen Substrat, bis eine deutlich sichtbare Trübung des Nährsubstrates auftritt. Sodann verteilt man die eingebrachten Bakterien in der Gelatine gleichmäßig, indem man durch vorsichtiges Neigen und rascheres Wiederaufstellen des Röhrchens die Probe durchschüttelt. Zweckmäßig hält man das Röhrchen mit den drei ersten Fingern der rechten Hand und stützt den Boden desselben auf den Kuppen der drei ersten Finger der linken Hand. Nach 60—100maligem Umlegen und Aufrichten der Probe ist eine genügende Verteilung der eingesäten Bakterien erreicht. Stammt das ursprüngliche Material von zähen oder festen Substraten, so verreibt man vor dem Umschütteln die groben Par-

tikelchen mit einer kleinen, ca. 1·5 *mm* im Durchmesser messenden Öse aus stärkerem Platindraht (0·5 *mm* Querschnitt). Nun nimmt man aus dem Warmwasserbad ein zweites Röhrchen mit Gelatine und verimpft drei Ösen voll des Inhaltes vom ersten Röhrchen (dem Original). Hierzu benutzt man große Platinösen mit einem Durchmesser von 6—8 *mm*. Diese Ösen bleiben nur dann nach dem Herausnehmen aus der Flüssigkeit gefüllt, wenn sie vollständig geschlossen sind, worauf besonders zu achten ist. Nunmehr verteilt man die eingebrachte Menge aus dem Original wieder durch 60maliges Umschütteln und erhält so die erste Verdünnung, von der man abermals 3 Ösen voll auf ein weiteres Röhrchen mit verflüssigter Gelatine verimpft. Jetzt wird die erste Verdünnung wieder in das Warmwasserbad von 33° C zurückgebracht. Die eben verimpfte Gelatine (zweite Verdünnung) wird ebenfalls durchgemischt und von ihr eventuell durch Verimpfen von 3 Ösen voll eine dritte Verdünnung angelegt, die genau so wie die früheren zu behandeln ist. Sterile Petrischalen legt man auf eine gekühlte Unterlage. Sehr empfehlenswert ist die in Fig. 367 wiedergegebene Vorrichtung, die aus einem Zinkblechkasten von runder Form besteht, der auf Nivellierschrauben ruht und durch den ein Strom kalten Wassers dauernd hindurchfließt.


Fig. 367.

Nunmehr nimmt man das Röhrchen mit der ersten Verdünnung, schüttelt es in der angegebenen Weise noch 20mal und entfernt bei schräger Haltung des Röhrchens den Wattebausch. Nun flammt man in der Flamme den Rand der Eprouvette unter Drehen derselben gut ab und probiert mit der Fingerbeere, die Eprouvette ruhig in der Hand in möglichst schräger Lage haltend, immer an ein und derselben Stelle, ob eine genügende Abkühlung derselben eingetreten ist. Ohne die Eprouvette zu drehen, wird nun der Inhalt über den nicht berührten Teil des Randes in die Petrischale rasch entleert, nachdem man den Deckel derselben gelüftet und zum Schutze vor einfallenden Mikroorganismen darüber hält. Durch leichtes Neigen der sofort wieder geschlossenen Schale verteilt man die Gelatine gleichmäßig über den ganzen Boden der Schale, ohne den Deckel irgendwie zu benetzen. Unsere Fig. 368 hält die einzelnen Phasen des ganzen Vorganges des Plattengusses fest. Ebenso wird mit der zweiten und dritten Verdünnung verfahren. Sowohl die Wattebäusche, die bei richtiger Arbeit nicht infiziert und benetzt werden dürfen, als auch die entleerten Proberöhrchen kommen in ein größeres Gefäß mit 3%iger Lysollösung, einerlei, ob man mit pathogenem oder nicht pathogenem Bakterienmaterial arbeitet.

Nach wenigen Minuten ist die Gelatine in den Petrischalen erstarrt. Nach Signierung der Schalen kommen die Platten, mit dem Boden nach

oben sehend, in den Thermostaten mit 22° C. Nach 12 Stunden beginnt man mit der Kontrolle, ob Wachstum eingetreten ist oder nicht. Dies geschieht unter dem Mikroskop, bei schwacher Vergrößerung von der Bodenseite her. Sobald sich kleine Kolonien zeigen, schreitet man zur Abimpfung, die wieder unter dem Mikroskop mit einer sterilen Platinnadel von dünnem Platindraht zu geschehen hat. Ohne irgendeinen Teil der Objektivfassung oder des Schalenrandes oder des umliegenden Nährsubstrates zu berühren, muß die Nadel soweit gesenkt werden, bis sie die eingestellte, oberflächliche Kolonie be-

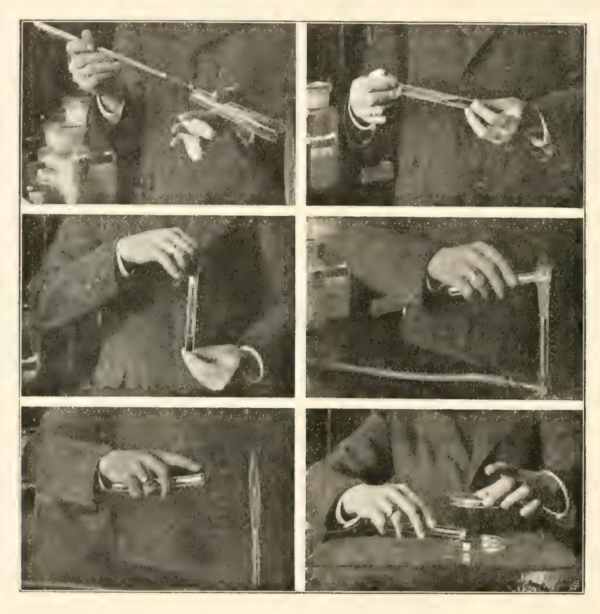


Fig. 368.

rührt und etwas von ihr mitnimmt. Diese geringe Menge wird dann in einen sterilen Nährboden gebracht, indem die abgeimpften Bakterien entweder in ein Proberöhrchen mit schräg erstarrter Agarfläche oder Gelatinefläche eingebracht und in einem Strich darauf übertragen werden, oder aber in gerade erstarrten Agar oder solche Gelatine durch einen Einstich eingeimpft werden. In flüssige Nährböden verimpft man leichter mit frisch hergestellten Glasnadeln. Man zieht sich im Brenner einen Glasstab in einen feinen Faden aus, den man in einer Entfernung von ca. 15 *cm* vom dickeren Teil mit einer ausgeglühten Federzange ab-

bricht. Zur Abimpfung unter dem Mikroskop wird nun der am Glasstab befindliche Faden sofort benutzt, da er ohnehin durch das Erhitzen beim Ausziehen sterilisiert wurde. Nun impft man in der angegebenen Weise ab und überträgt die am Glase heftenden Bakterien dadurch in die Flüssigkeit, daß man durch einen leichten Stoß die infizierte Nadelspitze abbricht und mit den Bakterien in der Nährflüssigkeit beläßt.

## 2. Der Agarplattenguß.

Der in Proberöhrchen sterilisierte Nähragar wird im kochenden Wasserbade verflüssigt und dann die Röhrchen in ein Wasserbad von 40° C eingesetzt. Nach Abkühlung des Inhaltes auf diese Temperatur wird wie beim Gelatineplattenguß verimpft, gemischt und die Verdünnungen angelegt. Man muß aber sehr rasch arbeiten, da Agar die Eigenschaft hat, nur bei einer Temperatur von über 38° C flüssig zu bleiben und einmal erstarrt, erst wieder bei ungefähr 90° zu verflüssigen. Nunmehr wird in sterile Schalen ausgegossen, die aber in diesem Falle keiner besonderen Kühlung bedürfen. Die weitere Behandlung und Verarbeitung deckt sich mit dem für Gelatineplatten Mitgeteilten. Nur die Züchtungstemperatur kann beliebig erhöht werden, ohne daß eine Verflüssigung eintritt.

Für pathologische Untersuchungen bedient man sich sehr häufig der Blutserum-Agarplatten. Hier benutzt man einen Nähragar mit 3% Agargehalt, den man in Eprouvetten sterilisiert vorrätig hält. Vor dem Gebrauch wird der verflüssigte und auf 40° C abgekühlte Nähragar mit dem auf 40° C erwärmten flüssigen Blutserum (S. 1215) zu gleichen Teilen gemischt, zu Platten verarbeitet und dann nach dem Erstarren mit dem zu untersuchenden Substrat bestrichen. Zu dem Ende benutzt man einen Pinsel von feinstem Platindraht, der vor dem Gebrauch ausgeglüht wird und mit dem nach einmaligem Eintauchen in das zu untersuchende Substrat sich kreuzende Striche auf der Platte ausgeführt werden. Will man mit dem Blutserumagar die üblichen Verdünnungen anlegen, so stellt man sie mit dem erwärmten Blutserum allein her, schüttelt gut durch, versetzt dann mit dem verflüssigten abgekühlten Agar und gießt Platten.

Um die mitunter sehr störende Bildung von Kondenswasser aus dem Agar auf ein Minimum herabzudrücken, kann man dem Nähragar 1% Gelatine zufügen, ohne den Erstarrungs- und Schmelzpunkt des Nährsubstrates wesentlich zu ändern.

## 3. Reinzucht von einer Zelle unter Kontrolle.

Die Reinzucht von einer Zelle weg erreicht man nach dem Verfahren von *E. Chr. Hansen*[1]): Man benutzt dazu eine feuchte Kammer und ein steriles Deckgläschen von 20 *mm* Seitenlänge. Als Feuchtkammer

[1]) *Hansen,* Comptes rendus de laboratoire de Carlsberg (1883). Die angegebene Methode ist etwas modifiziert.

verwendet man entweder hohl ausgeschliffene Objektträger oder Objektträger mit aufgekittetem Glasring, wie aus Fig. 369 zu entnehmen ist. Die Objektträger liegen in 80%igem Alkohol dauernd. Die in Salzsäure gereinigten Deckgläschen werden nach ausgiebiger Wasserspülung ebenfalls in starken Alkohol eingelegt, aufbewahrt. Unmittelbar vor Ausführung der Methode desinfiziert man eine kleine Glasglocke im Innern durch Auswischen mit 80%igem Alkohol, legt sich ein Blatt glattes Papier zurecht, das ebenfalls mit einem in Alkohol getauchten Wattebausch abgewischt wird und gibt auf dieses die Glasglocke. Hierauf entnimmt man einen hohl geschliffenen Objektträger dem Behälter mit Alkohol, läßt den überschüssigen Alkohol abtropfen und verbrennt den Rest in der Bunsenflamme. Dann bestreicht man den Rand des Glasringes mit Vaselin und legt den Objektträger unter die Glasglocke. Ein Deckgläschen wird in der Flamme vom anheftenden Alkohol befreit und ebenfalls unter die Glasglocke gegeben. In Fig. 370 sehen wir die vorbereiteten Gerätschaften. Nunmehr legt man in Röhrchen mit verflüssigter Gelatine in der auf S. 1231 angegebenen Weise zwei Verdünnungen an. Von der ersten Verdünnung bringt man mit der 4 *mm* im Durchmesser messenden Öse ein Tröpfchen auf ein nicht sterilisiertes Deckgläschen, das man nun mit der beschickten Seite nach unten auf den mit Vaselin bestrichenen Rand des Hohlschliffes eines Objektträgers aufdrückt. Dann bestimmt man in diesem hängenden Tropfen die Anzahl der Mikro-

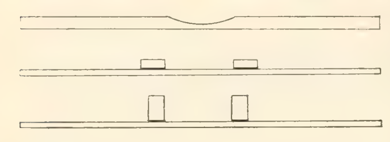


Fig. 369.



Fig. 370.

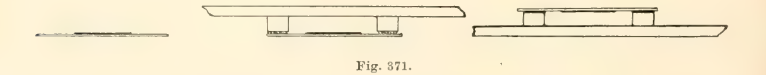


Fig. 371.

organismen unter dem Mikroskop. Die Zahl derselben muß 10—15 betragen. Ist dies durch entsprechendes Verdünnen erreicht, so beschickt man das unter der Glasglocke befindliche sterile Deckgläschen mit einer Öse (4 *mm* Durchmesser) voll Gelatine, indem man diese Menge auf einen 1 *cm* im Durchmesser betragenden Kreis rasch und gleichmäßig verteilt. Nunmehr stülpt man den Objektträger mit dem Glasring darüber und

drückt leicht an, bis durch das Vaselin ein kompletter Abschluß der Kammer erreicht ist. Unsere Fig. 371 gibt die Phasen dieser Prozedur wieder. Auf diese Art legt man sich 5—6 Deckglaskulturen an. Nach wenigen Minuten ist der Nährboden erstarrt. Jetzt untersucht man unter dem Mikroskop diese Miniaturplatten und markiert auf dem Deckglase durch Tuschpünktchen jene Stellen, die eine einzige Zelle enthalten und wo der Abstand von den umliegenden Zellen 1 *mm* beträgt. Nach 24 Stunden impft man von den aus einer Zelle hervorgegangenen Kolonien mit der spitzen Platiniridiumnadel ab, nachdem man das Deckgläschen mit der beschickten Seite nach oben auf die Feuchtkammer unmittelbar vor der Abimpfung gelegt hat.

Die zweite, ebenso sicher und vielleicht etwas bequemer zum Ziele führende Methode besteht darin, auf ein sterilisiertes Deckgläschen mit einer sterilisierten Schreibfeder reihenweise kleinste Tropfen von infizierter Gelatine zu bringen, wie es *Lindner* bei seiner Tröpfchenkultur mit flüssigen Nährsubstraten getan hat. Nun untersucht man wieder unter dem Mikroskop und isoliert jene Tröpfchen, die nur eine einzige Zelle enthalten. Nunmehr kann man diese Zelle sich vermehren lassen und ohne Hilfe des Mikroskops leicht mit einer Glas- oder Platinnadel die Kolonie abimpfen oder den Tropfen mit einer Zelle mit einer Platinöse in das sterile Substrat übertragen. Sicherer ist die erste Art des Abimpfens von der Kolonie, da man beim Übertragen der einen Zelle in das sterile Substrat niemals weiß, ob diese Zelle auch wachstumsfähig ist. Fig. 372 zeigt uns ein beschicktes Deckgläschen und die Stellung der Abimpfnadel während des Abtragens einer Kolonie. Nach dem Abimpfen kontrolliert man unter dem Mikroskop, ob etwas tatsächlich von der Kolonie abgenommen wurde.

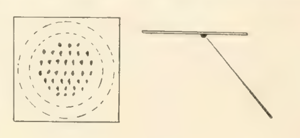


Fig. 372.

Bei der Zucht von größeren Mikroorganismen, wie Saccharomyceten, Schimmelpilze etc., hat man immer die Methode der Zucht von einer Zelle anzuwenden, da nur durch dieses Verfahren einwandsfrei Reinkulturen zu erhalten sind. Bei der Zucht von Schimmelpilzen geht man nicht von der vegetativen Zelle aus, sondern von der Spore, deren Keimung man unter dem Mikroskop verfolgt.

Die bisher genannten Methoden führen überall dort zum Ziele, wo es sich um sogenannte aërobe oder wenigstens fakultativ aërobe Mikroorganismen handelt. Für die Reinzucht der strengen und fakultativen Anaërobier sei die von *Burri*[1]) zuerst angegebene Methode empfohlen in der Ausführung, wie sie in unserem Laboratorium geübt wird. Dazu benutzt man starkwandige Röhren von ca. 10—12 *mm* innerer Lichte und

---

[1]) *R. Burri,* Zur Isolierung der Anaëroben. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 8. S. 533 (1902).

18—20 *cm* Länge. Diese werden sorgfältig gereinigt, beiderseits mit Wattebäuschen verschlossen, wie es *A* der Fig. 373 zeigt, in Papier eingehüllt und im Heißluftsterilisator keimfrei gemacht. Vor dem Gebrauche stülpt man über einen Wattebausch eine gutschließende Kautschukkappe und taucht dieses Ende der Röhre in Eiswasser, wie es *B* der Fig. 373 erkennen läßt. Hierauf verflüssigt man ein Röhrchen mit Nähragar und gießt nach Abflammen des Röhrchenrandes eine ca. 3 *cm* hohe Schicht siedend heißen Agars unmittelbar auf den Wattebausch, entsprechend klein *a* der Fig. 373 *B*. In wenigen Sekunden ist diese Agarschicht erstarrt. Nun legt man sich nach der für den Agarplattenguß auf S. 1233 gegebenen Vorschrift zwei

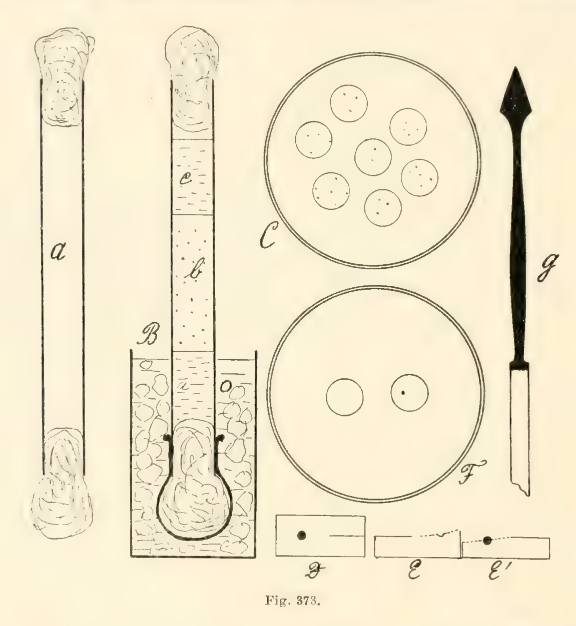



Fig. 373.

Verdünnungen an und gießt diese nach Abflammen des Agarröhrchenrandes auf die erste Agarschicht (*b* der Fig. 373 *B*). Nachdem auch diese Schicht erstarrt ist, kommt noch eine Lage von sterilem Agar darauf, indem man ein Röhrchen mit Nähragar verflüssigt und heiß auf dem infizierten Agarzylinder in ca. 3 *cm* dicker Schicht aufgießt (*c* Fig. 373 *B*). Mit der zweiten Verdünnung wird ebenso verfahren. Man kann die Kautschukkappe weggeben und stellt die fertigen Röhrchen in den Thermostaten mit 32° C. Sobald sich die Kolonien der eingeimpften, anaërob wachsenden Mikroben in der Agarschicht *b* zeigen, schreitet man zur Abimpfung, die folgendermaßen geschieht: Der mit Agar befeuchtete Wattebausch wird entfernt.

Dabei kommt es häufig vor, daß bereits alle drei Agarzylinder aneinanderhängend mit herausgezogen werden. Sollte dies nicht der Fall sein, so schiebt man den Agar mit einem dicken Glasstab vorsichtig heraus auf ein Blatt Filtrierpapier. Durch Hin- und Herrollen auf demselben befreit man die Agarwurst von der anhaftenden Feuchtigkeit. Dann schneidet man den beimpften Teil des Zylinders mit einem ausgeglühten Messer in dünne Scheibchen von 2—3 *mm* Dicke, die man sofort in einer sterilen Petrischale auflegt, wie es Fig. 373 *C* zeigt. Nachdem man so den ganzen Zylinder aufgeteilt hat, durchmustert man die Scheiben unter dem Mikroskope nach Kolonien, die wenigstens 2 *mm* vom Scheibenrande entfernt in der Tiefe weit voneinander abstehend liegen. Scheiben, die Kolonien in dieser brauchbaren Lage besitzen, werden in eine zweite sterile Petrischale gebracht und dort folgendermaßen zur Abimpfung bloßgelegt: Mit einer abgeflammten und wieder erkalteten Lanzennadel (Fig. 373 *G*) schneidet man vorsichtig, vom entfernteren Rand der Scheibe beginnend, die Scheibe gegen die Kolonie hin ein bis in eine Entfernung von 2 *mm*, wie es der schwarze Strich in *D* der Fig. 373 zeigt, in welcher Abbildung der schwarze Punkt die Kolonie bedeutet. Dann nimmt man eine zweite zurecht gelegte und abgeflammte Lanzennadel zu Hilfe und spaltet durch Auseinanderdrängen der Schnittflächen die Agarscheibe weiter, ohne mit den beiden Nadeln die entstehenden Bruchflächen zu berühren. Gewöhnlich verläuft die Spaltrichtung durch die Kolonie hindurch. Mitunter ist sie aber von einer dünnen Agarschicht bedeckt, was weiter nichts zu bedeuten hat. *E* und *E'* zeigen uns das Ergebnis der vorgenommenen Spaltung. In *F* der Fig. 373 sehen wir die gespaltene Agarscheibe mit freigelegter Kolonie in der Petrischale liegen. Nun nimmt man die Abimpfung in der auf S. 1232 beschriebenen Weise vor und legt entweder Stichkulturen in hoher Schicht oder Strichkulturen an, die dann unter Ausschluß von Luftsauerstoff gehalten werden müssen. Die dazu brauchbaren Verfahren werden im folgenden Kapitel zur Erörterung gelangen.

Auch von der einzelnen Zelle weg unter mikroskopischer Kontrolle kann anaërob gezüchtet werden. Nach dem Vorschlage von *Nikiforoff* benutzt man dazu Objektträger mit aufgekittetem Glasring, also feuchte Kammern, die längs des inneren Randes vom Ringe eine eingeschliffene Rinne besitzen. In diese kommt auf der einen Seite eine geringe Menge Pyrogallol, auf die gegenüberliegende ein Tröpfchen Kalilauge. Die Herstellung der Kultur erfolgt auf einem sterilisierten Deckglas in der auf S. 1234 bezeichneten Weise. Das Deckgläschen wird dann mit der beimpften Seite nach unten auf den mit Vaselin bestrichenen Glasring gelegt und angedrückt. Nach völliger Abkühlung umzieht man es noch mit einem Lack (Asphaltlack). Dann neigt man den Objektträger vorsichtig, bis der Kalilaugentropfen in der Rinne zum Pyrogallol fließt. Die weitere Abimpfung gestaltet sich so, wie es auf S. 1235 für die Zucht aus einer Zelle angegeben wurde.

## IV. Anaërobe Zucht und Kultur in bestimmten Gasen oder Gasgemischen.

Für die anaërobe Zucht verwendet man dort, wo es überhaupt geht, unmittelbar vor der Kulturanlage ausgekochte Nährsubstrate. Natürlich geht dies mit Blutserum oder anderen in der Hitze koagulierenden Substanzen nicht. In diesen Fällen bringt man die Nährsubstrate möglichst unmittelbar vor dem Gebrauche unter den Rezipienten einer guten Luftpumpe durch wenigstens eine halbe Stunde.

Die Absperrung und Entfernung des Luftsauerstoffes erreicht man auf verschiedene Weise. Die einfachste Methode besteht darin, eine Kultur in hoher Schicht anzulegen. Zu diesem Ende benutzt man am besten frisch erstarrten Nähragar in engen und hohen Proberöhrchen. Es wird eine Stichkultur mit der Platinnadel durch senkrechtes, bis zum Boden reichendes Einstechen ausgeführt und darüber noch eine Schicht Agar von mindestens 3 *cm* Höhe gegossen. *Liborius* macht das gleiche bei Gelatinenährsubstraten. Diese Kulturen gestatten zwar eine gute Beobachtung der makroskopisch wahrnehmbaren Wachstumserscheinungen im Stichkanal, bieten aber große Schwierigkeiten bei der Entnahme von Kulturmaterial zur Abimpfung und mikroskopischen Untersuchung.

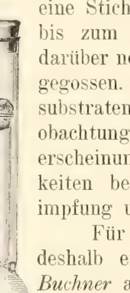


Fig. 374.

Für einfachere Anaërobenversuche bedient man sich deshalb einer zweckmäßigeren Kulturmethode, die von *Buchner* angegeben wurde und allgemein als Kultur in der Buchnerröhre bekannt ist. Nebenstehende Fig. 374 zeigt uns zwei Röhren, die in ihrem Innern die gewöhnlichen Kulturröhrchen enthalten. Man legt auf einem frisch ausgekochten, schräg erstarrten Agar- oder Gelatinenährboden eine Strichkultur an, dann beschickt man entweder die kugelförmige Auftreibung der Buchnerröhre oder den unteren Teil derselben (Fig. 374, links) mit Pyrogallussäure in Substanz, und zwar ca. 0·20 *g*. Hierauf läßt man durch einen langgestielten Trichter 0·25%ige Kalilauge einfließen (8 *cm*³). Nunmehr schiebt man die Kulturröhre ein und verschließt sofort mit einem dichtsitzenden Kautschukstopfen. Die alkalische Pyrogallollösung absorbiert den Sauerstoff und hält die Kultur O-frei. Absolut sicher ist das Verfahren nicht, da kein Indikator etwa vorhandenen Sauerstoff anzeigt und die Absorptionsfähigkeit der geringen Menge alkalischer Pyrogallollösung sehr bald nachläßt und endlich ganz erlischt. Außerdem sind die Kautschukstopfen nicht gasdicht, denn so gezüchtete Leuchtbakterien leuchten ausgezeichnet. Erst vollständiges Abschmelzen der Röhre bewirkt einen sicheren Ausschluß von Sauerstoff. Dann leuchten auch die Leuchtbakterien nicht mehr. Wo es sich um sehr exakte Versuche handelt, ist daher unbedingt die Kulturröhre nach der Beschickung abzuschmelzen.

Ein ebenfalls sehr brauchbares Verfahren hat uns *Omelianski*[1]) angegeben. Nach ihm kommt die frisch angelegte Kultur in das in Fig. 375 gezeichnete Gefäß. Dasselbe besteht aus einem dickwandigen Gefäß *A*, welches oben einen ringförmigen Kragen *C* trägt und unten einen erweiterten Fuß von 8 *cm* besitzt. Der Zylinder hat einen Durchmesser von 1·8 *cm*. Der Durchmesser des Kragens beträgt 5·5 *cm*. Auf das obere Ende des Zylinders ist die Kappe *B* gut aufgeschliffen. Unmittelbar vor dem Gebrauche wird die Kappe mit einer Mischung von 1 Teil Wachs und 2 Teilen Vaselin aufgedichtet. Dann bringt man je 10 $cm^3$ einer 12·5%igen Kalilauge und einer 5%igen Pyrogallollösung (wässerig) in den Fuß des Apparates. Nunmehr wird das Kulturröhrchen eingesetzt und die Kappe gut aufgerieben und in den Kragen soviel Quecksilber gegossen, daß der untere Kappenrand reichlich damit bedeckt ist (schwarz in der Figur). Als Absorptionsmittel erweist sich die oben genannte Menge von Pyrogallol in Kalilauge am zweckmäßigsten und am besten und raschesten wirksam, wenngleich geringe Mengen von CO gebildet werden (vergl. *Beilstein*, Handbuch der organischen Chemie. Bd. 2. S. 643 [1888]: „Am wirksamsten ist eine Lösung von je 0·25 *g* Pyrogallol in 100 $cm^3$ Kalilauge [spezifisches Gew. = 1·050]; bei stärkerer Konzentration der Lauge wird weniger Sauerstoff absorbiert.")

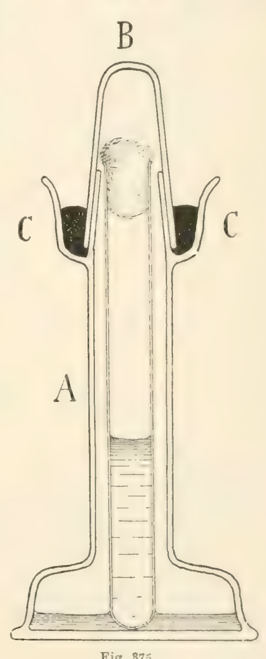


Fig. 375.

Die bisher genannten Apparate gestatten überhaupt nur die Züchtung im Reagenzglase und nur in der Einzahl, d. h. für jedes Kulturröhrchen ist ein besonderer Anaërobenapparat nötig. Nun kommt es häufig vor, viele Kulturen gleichzeitig anlegen oder Plattenkulturen unter anaëroben Verhältnissen halten zu müssen.

Für die Plattenzucht unter Ausschluß des Luftsauerstoffes sei auf das Verfahren von *Ružička*[2]) in der in unserem Laboratorium gebräuchlichen Abänderung verwiesen, das folgendermaßen ausgeführt wird. An Utensilien werden gebraucht:

---

[1]) *W. Omelianski*, Ein einfacher Apparat zur Kultur von Anaëroben im Reagenzglase. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 8. S. 711 (1902).

[2]) *St. Ružička*, Eine neue einfache Methode zur Herstellung sauerstoffreier Luftatmosphäre (als Methode zur einfachen vollständigen Züchtung von strengen Anaëroben). Arch. f. Hygiene. Bd. 58. S. 327 (1906).

1. Ein *Kipp*scher Wasserstoffentwicklungsapparat mit zwei daran geschlossenen Waschflaschen. Die erste enthält eine $10^0/_0$ige Lösung von salpetersaurem Blei, die zweite eine $10^0/_0$ige Lösung von Silbernitrat. Den Wasserstoff erzeugt man aus reinstem granulierten Zink und ungefähr $30^0/_0$iger reinster Schwefelsäure.

2. Zwei runde Glasschalen von 20—25 *cm* Durchmesser und 8—10 *cm* Höhe.

3. Eine Glasglocke von ca. 15 *cm* Durchmesser und 30 *cm* Höhe.

4. Einen kleinen Glasdreifuß von ca. 9 *cm* Höhe, auf den die Petrischalen zu stehen kommen.

5. Eine halbe Petrischale von 10—11 *cm* Durchmesser.

6. Ein gebogenes Glasrohr mit ausgezogener feiner Spitze von der Form *a* der Fig. 376 in der Seitenansicht und *b* dieser Figur in der Vorderansicht ($^1/_2$ natürl. Größe).

7. Ein Röhrchen, mit 4 Biegungen. An den geraden längeren Schenkel wird ein Kautschukschlauch angesetzt, der das Rohr mit einer Bürette verbindet und einen Quetschhahn trägt. Der gerade Schenkel mißt 12 *cm*, der wagrechte 3 *cm*, der aufwärtsgehende 11 *cm*, der sich daranschließende kürzere umgebogene, in eine ausgezogene Spitze endigende Teil 3 *cm* (siehe Fig. 378, rechts).

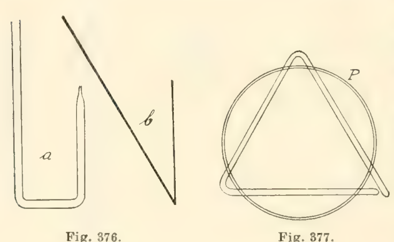


Fig. 376. Fig. 377.

8. Sechs Stück Dreiecke aus Glasstäben, von der Form der Fig. 377, die als Zwischenlagen für die einzelnen Petrischalen dienen; *P* entspricht dem Rand der aufgelegten Schale. Die Petrischalen sollen einen Durchmesser von 9 *cm* haben.

9. Eine Reihe folgender Reagenzien:

*a)* $1^0/_0$ige Karbolsäurelösung in Wasser.

*b)* $20^0/_0$ige Kristallsodalösung.

*c)* Traubenzucker, puriss. wasserfrei Merck, abgeteilt in Portionen von 50 *g*, 1 *g* und 0·1 *g*, die in gut verschlossenen Proberöhrchen aufbewahrt werden.

*d)* Paraffinöl.

*e)* KOH, in Portionen von ca. 1·6 *g* abgeteilt und in kleine Glasröhrchen mit Paraffinverschluß aufbewahrt, oder noch besser eingeschmolzen. (Man wiegt eine Stange rasch ab, legt sie auf eine Glasplatte, die auf einem Millimetermaßstab liegt und zerteilt die Stange mit dem Messer in dem Gewicht entsprechende Stücke).

*f)* Pyrogallol, in Portionen von 0·8 *g* abgeteilt und in kleinen Gläschen aufbewahrt.

Eine Indigolösung, die folgendermaßen hergestellt wird:

3 *g* Indigotin werden in einer Reibschale mit konzentrierter Schwefelsäure (60 *g*) verrieben und durch 24 Stunden stehen gelassen. Nunmehr bestimmt man das Volumen und verdünnt mit der genau vierfachen Menge destillierten Wassers. Von dem entstandenen Niederschlag wird abfiltriert. 1 $cm^3$ dieser Indigolösung soll einen Schwefelsäuregehalt aufweisen, der 38·2 $cm^3$ $^1/_{10}$-Normalalkali entspricht. Den Titer bestimmt man, indem man in einer Porzellanschale 5 $cm^3$ der Indigolösung mit 3—5 $cm^3$ konzentrierter Salpetersäure versetzt und auf dem Wasserbade eindampft, bis zur Verjagung der $HNO_3$. Den Rest nimmt man in einem Meßkolben von 100 $cm^3$ Inhalt mit Wasser auf und verdünnt genau bis zur Marke. Von dieser Lösung titriert man 20 $cm^3$ unter Benutzung von Phenolphtalein als Indikator. Nun korrigiert man durch Zusatz von $H_2O$ oder $H_2SO_4$ den Säuregehalt der ursprünglichen Indigolösung entweder so lange, bis er einer Menge von 38·2 $^1/_{10}$-Normalalkali entspricht, oder aber berechnet die Menge von Indigolösung, die diesem Säuregehalt entspricht. Letzteres Verfahren ist empfehlenswerter, da es rasch und sicher zum Ziele führt. Die Hälfte der berechneten Menge ergibt sofort die für eine Indikatorherstellung nötige Indigolösungmenge. Die Herstellung des fertigen Sauerstoffindikators wird später angegeben.

Die Ausführung dieser anaëroben Zucht geschieht auf folgende Weise: In die runde Glasschale kommt eine Mischung von:

500 $cm^3$ 1%iger wässeriger Karbolsäurelösung,

70 $cm^3$ 20%iger Lösung von kristallisiertem Natriumkarbonat,

50 *g* Traubenzucker.

Darauf wird 500 $cm^3$ Paraffinöl gegossen. Nun stellt man in die Mitte der Schale den gläsernen Dreifuß und gibt darauf die halbe Petrischale, in der man eine Portion Pyrogallol und eine Portion KOH bringt. Darauf legt man ein Glasdreieck und stellt auf dieses, mit dem Boden nach oben gewendet, die offene Kulturschale. Dann folgt wieder ein Glasdreieck und eine beschickte Kulturschale, wie es Fig. 378 zeigt. Nun verbindet man mit dem Wasserstoffapparat das gebogene Röhrchen der Fig. 376. Das andere Röhrchen mit abgebogener Spitze wird durch einen Kautschukschlauch mit einer mit frisch ausgekochtem Wasser gefüllten Bürette verbunden, der Schlauch mit einem Quetschhahn versehen und so weit Wasser zuströmen gelassen, bis das Röhrchen bis zur Spitze gefüllt ist. Nunmehr stellt man sich die Indikatorlösung her. Als solche dient für die Zucht bei Zimmertemperatur (18—20° C) folgende Flüssigkeit:

50 $cm^3$ einer 1%igen Karbolsäurelösung,

5 $cm^3$ einer 20%igen kristallisierten Natriumkarbonatlösung.

**Ohne Erwärmen** wird darinnen gelöst:

1 *g* chemisch reiner Traubenzucker

und nach der Lösung zugesetzt 0·5 $cm^3$ der schwefelsauren Indigolösung bzw. die Menge, welche der oben angegebenen Alkalimenge (19·1 $cm^3$ $^1/_{10}$ N) im Säuregehalt entspricht.

Für die Zucht bei 32—37° C fügt man dem oben genannten Soda-Karbolsäuregemisch zu

0·1 *g* Traubenzucker, puriss. Merck,

löst **ohne Erwärmen** und setzt dann die gleiche Menge Indigolösung zu wie früher.

Die Indikatorflüssigkeit kommt in ein kleines Bechergläschen und wird auf den Boden der obersten Petrischale gestellt. Ein viel leichter herzustellendes und dennoch äußerst empfindliches Reagenz auf Sauerstoff sind Leuchtbakterien. Man stellt an Stelle des Indigoindikators einfach eine offene Plattenkultur einer Leuchtbakterie hinein. Sehr geeignet dazu ist das Bacterium phosphorescens *Fischer* (vergl. Leuchtbakterien im Abschnitt IX).

Die Platten werden mit Agar genau so gegossen und verimpft, wie dies auf S. 1233 für den Agarplattenguß mitgeteilt wurde.

Nun läßt man Wasserstoff zuströmen und entzündet ihn an der Spitze des Ausströmröhrchens (links in Fig. 378). Die Flamme soll eine Höhe von 4 bis 5 *mm* haben. Hierauf stülpt man die Glasglocke darüber. Es verbrennt der anwesende Sauerstoff langsam und Sperrflüssigkeit steigt in die Glocke. Man hebt durch Drehen des Rohres das Wasserstofflämmchen vorsichtig, so daß es immer nahe an der Ölschichte brennt. Das Verlöschen macht sich an einem plötzlichen Ruck oder Flüssigkeit in der Glocke bemerkbar. Nun stellt man den *Kipp*schen Apparat sofort ab und entfernt bei vorsichtigem Heben der Glocke das Brennerröhrchen. Nunmehr läßt man aus der Bürette 25 $cm^3$ Wasser in die große Petrischale mit Pyrogallol und KOH tropfenweise einströmen, um ein Spritzen auf den Agarnährboden zu vermeiden. Dann stellt man den Wasserzufluß ab und nimmt auch das Wasserzuströmröhrchen heraus. Der letzte Sauerstoffrest wird durch die alkalische Pyrogallollösung entfernt. Wir haben dabei alle Gase

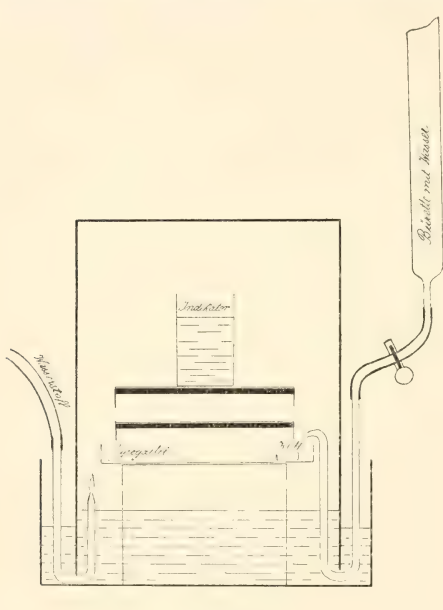



Fig. 378.

der Luft in unserem Zuchtapparat mit Ausnahme von Sauerstoff und Kohlensäure. Der jetzt entfärbte Indikator zeigt sofort durch Blauwerden die geringsten Spuren von Sauerstoff an, woran man mit Leichtigkeit Störungen der Anaërobiose wahrnimmt. Von der Funktionsfähigkeit desselben überzeugt man sich sehr leicht, indem man ein Luftbläschen einbläst. Er muß sofort durch oberflächliche Blaufärbung reagieren. Wurden Leuchtbakterienkulturen eingestellt, so zeigt das Erlöschen des Bakterienlichtes sofort die vollständige Abwesenheit von Sauerstoff an. Jede Spur eingebrachten Sauerstoffes bringt sie zum sofortigen Aufleuchten.

Bei der Eröffnung des Kulturapparates hebe man nicht ohneweiters die Glasglocke ab, sondern bringe ein einseitig mit einem kleinen Stopfen verschlossenes **S**-förmig gebogenes Glasrohr so unter die Glocke, daß es mit der offenen Seite die Flüssigkeitsschicht überragt. Durch Öffnen des Röhrchens stelle man eine Verbindung mit der äußeren Luft her und hebe dann die Glocke ab, was nun ohne stürmisches Lufteinströmen geschieht. Handelt es sich um gasbildende Mikroben, so ist es zweckmäßig, oben auf die Glocke eine Bleiplatte oder ein schweres Gewicht zu stellen, um ein stürmisches Entweichen des unter hohem Druck stehenden Gases zu vermeiden.

Bei den bisher beschriebenen Methoden der anaëroben Zucht wurde der Sauerstoff entweder mechanisch abgehalten oder durch Absorptionsmittel entfernt. Mit dem besten Erfolge kann man die atmosphärische Luft auch durch eine Reihe von indifferenten Gasen ersetzen. Die gebräuchlichste Methode dieser Art besteht darin, die Luft durch Wasserstoff zu verdrängen.

Für Einzelkulturen wurden zu diesem Zweck besondere Kulturgläser erdacht. Die einfachste und zugleich bequemste Methode besteht darin, das beimpfte Röhrchen in ein größeres zu geben und dieses mit einem doppelt durchbohrten Kautschukstopfen zu versehen, durch welchen zwei Röhrchen hindurchgehen. Das kürzere dient zum Einleiten des Wasserstoffes, das längere zum Ableiten der Luft bzw. des Wasserstoffes. Unsere Fig. 379 zeigt die ganze Anordnung. An das bis zum Boden des größeren Zylinders reichende Rohr ist eine kleine, mit doppelt durchbohrtem Stopfen versehene Eprouvette angeschlossen, die ungefähr zur Hälfte mit Wasser gefüllt ist. Mit dem Apparat ist das längere zum Boden reichende Rohr verbunden, das kurze Rohr ist rechtwinkelig gebogen und besitzt eine feine Ausströmöffnung. Die auf frisch ausgekochtem Nährboden angelegte Kultur kommt in die große Eprouvette, welche sofort mit dem doppelt durchbohrten Kautschukstopfen verschlossen wird. Nun verbindet man das kurze Röhrchen mit dem Wasserstoffgenerator, das längere mit der kleinen Vorlage und läßt einen sehr langsamen Wasserstoffstrom hindurchgehen, bis die gesamte Luft durch Wasserstoff ersetzt ist. Nach einiger Zeit (ca. 10′) versucht man an dem ausgezogenen Rohr der kleinen Vorlage den Wasserstoff zu entzünden. Brennt er ruhig, so läßt man noch fünf Minuten den Gasstrom hindurchgehen. Zeigen sich Explosionen oder unruhiges Brennen,

so ist noch ein Gemisch von Luft und Wasserstoff im Apparat. Dann beschleunigt man ein wenig den Gasstrom und probiert nach einigen Minuten neuerlich. Nach Abwarten der angegebenen Zeit schmilzt man zuerst das abführende Röhrchen des Zylinders ab (eingezogene Stelle des Rohres in Fig. 379). Dann wird das Zuströmröhrchen ebenfalls abgeschmolzen. Wenn unter möglichst sicherem Abschluß von Sauerstoff in solchen Apparaten kultiviert werden soll, muß eine etwas weitere große Eprouvette verwendet werden und außerdem ein langer Kautschukstopfen eingesetzt und mit Paraffin vergossen werden. Überdies empfiehlt es sich, als Indikator eine Leuchtbakterienkultur mit einzuschließen. Das letztere gilt auch für den weiter unten beschriebenen Zuchtapparat für anaërobe Bakterien.

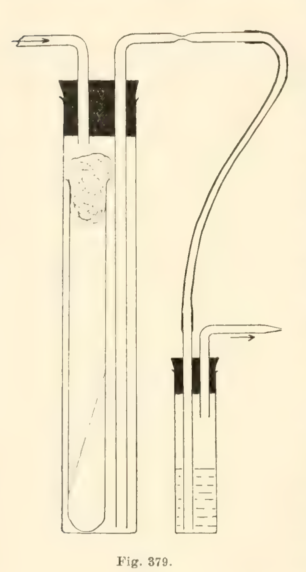


Fig. 379.

Sowohl für die Anlegung dieser Zuchten als auch für den Gebrauch beim konstanten Durchleiten von Gasen dürfen nur vollständig gereinigte Gase zur Verwendung kommen. In unserem Laboratorium wird folgendermaßen hergestellter Wasserstoff zu diesen Zwecken verwendet. Ein *Kipp*scher Apparat wird mit reinstem granulierten Zink in der üblichen Weise beschickt und dann mit verdünnter chemisch reiner Schwefelsäure (ca. 30⁰/₀ig) gefüllt. Der Wasserstoff passiert drei Waschflaschen, die erste, unmittelbar am Gasgenerator angeschlossene enthält eine 10⁰/₀ige wässerige Lösung von salpetersaurem Blei, die folgende eine 10⁰/₀ige Lösung von salpetersaurem Silber und die dritte eine konzentrierte Lösung von Kaliumpermanganat in 3—4⁰/₀iger chemisch reiner Schwefelsäure. In die Kugel des Auslaufrohres der letzten Waschflasche kommt ein dichter Wattebausch, um mitgerissene Flüssigkeitsteilchen abzufangen.

Für die gleichzeitige Zucht mehrerer Reagenzglaskulturen oder Plattenkulturen in der Wasserstoffatmosphäre benutzen wir den in Fig. 380 abgebildeten Apparat, der vollständig aus Glas hergestellt ist. Er dient auch zur Zucht in beliebigen anderen Gasen und im Gasstrom.

Er besteht aus einem Bodengefäß, das durch Einkitten einer zweiten runden Glasschale in eine größere, gleich hohe Glasschale hergestellt ist. Die dadurch entstehende Rinne hat einen Querschnitt von ca. 2 *cm*. In die Mitte dieser Rinne kommt der Glassturz zu stehen, der oben zwei Öffnungen trägt, die mit tadellosen Schliffen versehen sind. In die linke Öffnung (der Zeichnung Fig. 380) ist ein Rohransatz eingeschliffen, der

einen ebenfalls vorzüglich dichten Hahn mit einfacher Bohrung trägt. In die andere Öffnung ist ein bis auf eine Entfernung von 1 *cm* an den Boden der inneren Schale reichendes Rohr eingeschliffen, das außen ebenfalls einen gut gedichteten Gashahn trägt und nach dem Hahn noch einen Ansatz besitzt, auf den ein oben offenes Gefäß aufgesetzt ist, dessen Kubikinhalt ca. 40 $cm^3$ beträgt. Dasselbe besitzt zwei Marken. Die innere Schale enthält noch einen ca. 5 *cm* hohen gläsernen Dreifuß, der die Kulturschalen trägt. Er ist in der Zeichnung durch die dicken, rechten Winkel angedeutet. Die offenen und mit dem Boden nach oben gerichteten Kulturschalen werden durch gleichschenkelige Dreiecke aus Glasstäben voneinander getrennt gehalten, so daß das Gas überall freien Zutritt findet. Auf dem Boden der obersten Schale wird ein kleines Bechergläschen zur Aufnahme des Indikators gesetzt oder eine Leuchtbakterienkultur aufgestellt. Unmittelbar vor dem Gebrauche werden sämtliche Schliffstellen mit einem Gemisch von 3 Teilen Lanolin und 1 Teil Vaselin gedichtet.

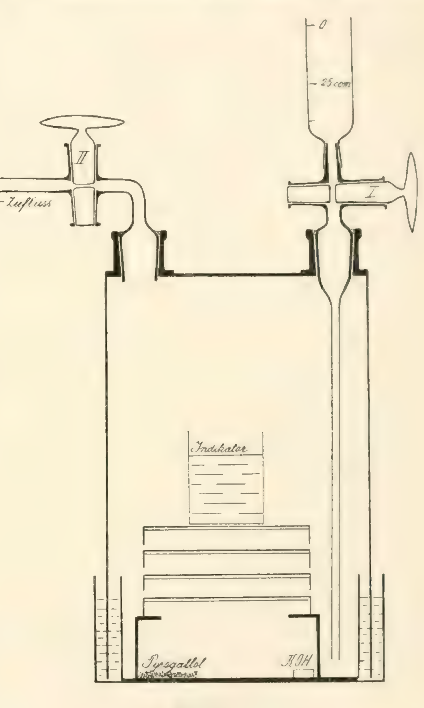


Fig. 380.

Der Apparat wird folgendermaßen in Betrieb gesetzt: In die Rinne kommt eine 5 *cm* hohe Schicht von Sperrflüssigkeit, deren Zusammensetzung auf S. 1241 angegeben ist. Auf diese kommt eine $^1/_2$ *cm* dicke Schicht von Paraffinöl. Auf den Boden der kleineren Schale kommen 1·25 *g* Pyrogallussäure auf der einen Seite und gegenüber 3·25 *g* KOH in Substanz. Nun wird der Glasdreifuß eingesetzt (etwas seitlich wie in der Abbildung) und auf diesen die eben angelegten Agar- oder Gelatinekulturen in Petrischalen, deren Boden nach aufwärts gekehrt ist. Auf dem Boden der letzten Kulturschale wird das Bechergläschen mit der auf S. 1241 angegebenen Indikatorflüssigkeit oder eine Leuchtbakterienkultur gestellt.

Nun stülpt man die Glasglocke darüber und verbindet den kurzen Rohransatz mit der letzten Waschflasche des Wasserstoffapparates, den langen Rohransatz nach Abnahme des kleinen aufgeschliffenen Gefäßes durch einen Kautschukschlauch mit einer kleinen, mit Wasser gefüllten Vorlage, wie sie beim Verfahren für die Einzelzucht von Reagenzglaskulturen in der Wasserstoffatmosphäre auf S. 1243 beschrieben und in Fig. 379 abgebildet ist. Man läßt nun langsam Wasserstoffgas solange durchströmen, bis der aus der kleinen Vorlage austretende Wasserstoff mit ruhiger Flamme verbrennt. Nun schließt man die Hähne am Gasgenerator und an den beiden Rohransätzen des Apparates, entfernt die Schlauchverbindungen, setzt auf den langen Rohransatz das Becherchen auf (Fig. 380) und füllt es bis zur Marke *O* mit frisch gekochtem, ausgekühlten Wasser, wobei darauf zu achten ist, daß eine vollständige Füllung bis zum Hahn erreicht wird. Hierauf öffnet man den Hahn *I* und dann vorsichtig den Hahn *II*. Jetzt fließt langsam Wasser ein. Sobald es im Becherchen bis zur Marke 25 $cm^3$ gefallen ist, sperrt man den Hahn *II* und gießt vorsichtig neuerlich bis zur Marke *O* Wasser nach. Hierauf öffnet man wieder den Hahn *II* und läßt weitere 25 $cm^3$ einfließen. Dann schließt man beide Hähne und nimmt das Becherchen ab. Das Gefäß ist allseitig geschlossen und wird nun in die für die betreffende Bakterienart passendste Temperatur gegeben. Zur Sicherheit kann man auf die Glocke noch ein schweres Gewicht legen, um bei stärkerem Innendruck ein eventuelles Kippen sicher hintanzuhalten. Es ist übrigens sehr zu empfehlen, dann, wenn bei Temperaturen über der Zimmertemperatur gezüchtet wird, schon das Durchleiten des Gases und das Füllen des Apparates bei dieser Temperatur vorzunehmen und den ganzen Apparat vorher auf die Zuchttemperatur vorzuwärmen.

Die rasche Wegschaffung der flüchtigen Stoffwechselprodukte bei anaëroben (auch aëroben) Zuchten ist mitunter für Beobachtungen von Wachstumserscheinungen und Umsetzungsvorgängen von großem Werte. Für diese Untersuchungen ist der soeben beschriebene Züchtungsapparat sehr verwendbar.

Bei der Ausübung dieses Verfahrens wird bis zum Wassereinlauf gleich wie früher verfahren. Vor diesem wird aber an den Kautschukschlauch, der den Apparat mit dem Wasserstoffgenerator verbindet, in unmittelbarer Nähe des Apparatansatzrohres ein Schraubenquetschhahn eingelegt und zugedreht. Erst jetzt entfernt man die Kautschukverbindungen und läßt in der angegebenen Weise Wasser einströmen. Nach Schluß der Hähne wird jetzt der lange Rohransatz nach Abnahme des aufgeschliffenen Gefäßes mit dem Gaserzeuger verbunden. Dann wird der kurze Rohransatz mit dem kurzen Rohr einer Waschflasche ohne Füllung verbunden. Das bis zum Boden reichende Rohr der letzteren wird mit dem langen Rohr einer zweiten Waschflasche zusammengefügt, die mit Wasser gefüllt ist. Diese nachgeschalteten Waschflaschen haben den Zweck, bei Druckschwankungen ein Rückströmen von Luft zu verhindern. Nunmehr werden sämtliche Hähne geöffnet und ein langsamer Wasserstoffstrom hindurchgeschickt. Man stellt

den Hahn des *Kipp*schen Apparates so, daß ungefähr im Sekundentempo die Gasblasen die Waschflaschenflüssigkeit durchsetzen. Bei diesen Versuchen sind die längeren Verbindungen durch Glasröhren herzustellen, die knapp aneinander schließen und durch ein Stück Druckschlauch verbunden sind, das über beide Rohrenden wenigstens 3 *cm* hinwegzieht. Geschieht die Zucht in kleineren Thermostaten, so stellt man nur den Zuchtapparat hinein und läßt die Waschflüssigkeiten draußen. Wenn der Wasserstoffabfluß im Innern erfolgt, ist der Thermostat sehr gut zu ventilieren, damit nicht durch angesammelte Knallgasmengen unliebsame Explosionen entstehen.

## V. Bestandteile von Pilzen und Bakterien.

### A. Mikrochemische Methoden zum Nachweis der Bestandteile von Bakterien und Pilzen.

Die hier genannten chemischen Reaktionen werden unmittelbar unter dem Mikroskope ausgeführt. Man bringt bei Bakterien eine Aufschwemmung derselben auf einen gereinigten Objektträger und läßt sie lufttrocken werden. Dann bedeckt man das trockene Ausstrichpräparat mit einem

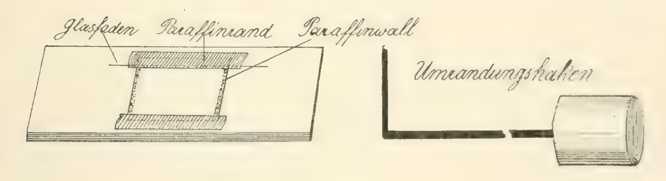



Fig. 381.

Tröpfchen Wasser und legt an der einen Längsseite des Objektträgers einen feinen Glasfaden auf und dann ein Deckgläschen, unter dem sich der Wassertropfen gleichmäßig verteilt. Hierauf umrandet man die den Längsseiten des Objektträgers parallelen Deckgläschenseiten mit geschmolzenem Paraffin, was am leichtesten mit einem rechtwinkelig abgebogenen Stück Draht geschieht, der in einen Korkstöpsel eingestochen ist. Fig. 381 zeigt uns das für mikrochemische Reaktion fertige Präparat samt dem für die Paraffinumrandung nötigen Drahthaken. Das Reagens bringt man nun mit einem Glasstabe an den einen offenen Rand des Deckgläschens, während man an den anderen Rand desselben ein Streifchen Filtrierpapier soweit heranschiebt, bis es die unter dem Deckglas befindliche Flüssigkeit berührt. Durch die Saugwirkung wird nun das Reagens eingesaugt. Man kann so eine Reihe von Reagenzien auf ein und dieselbe Zelle einwirken lassen, wenn man jede Verschiebung des Objektträgers vermeidet. Deshalb ist es notwendig, den Objektträger auf den Tisch des Mikroskopes mit den Klammern festzuklemmen. Beim Arbeiten mit Immersionssystemen

empfiehlt es sich, einen schmalen Schutzwall von Paraffin auf die beiden offenen Deckglasseiten zu legen, um ein Überfließen von Reagenzien auf die obere Deckglasseite sicher hintanzuhalten. Dieser Wall ist in Fig. 381 (linkes Bild) durch Punkte angedeutet. Untersucht man Hyphen von höheren Pilzen, so legt man diese einfach in Wasser unter das mit einem Glasfaden einseitig erhöhte Deckglas und verfährt weiter wie oben mitgeteilt. Die Fruchtkörper höherer Pilze können auch mit dem Mikrotom in Teile zerlegt und diese dann mikrochemisch untersucht werden. Es sei besonders auf die Methoden der Mikrochemie hingewiesen, da sie in der mykologischen Technik berufen sind, eine besonders wichtige Stelle einzunehmen. Auch für die Untersuchung der Stoffwechselprodukte in den Kolonien sind sie sehr brauchbar. *Behrens*[1]) hat eine sehr wertvolle Anleitung zur mikrochemischen Analyse gegeben, auf die hier besonders aufmerksam gemacht sei. Ebenso sei hingewiesen auf die Mikrotechnik von *Zimmermann.*[2]) Auf die üblichen makrochemischen Untersuchungsmethoden wird hier nicht weiter eingegangen, da dieselben ohneweiters zur Analyse der Pilze und Bakterien angewendet werden können und an den verschiedenen Stellen dieses Handbuches genau abgehandelt sind (Nachweis und Bestimmung von Stickstoff, Eiweißkörpern und deren Abkömmlingen, Kohlenhydrate etc.).

### *a)* Zellwandbestandteile.

Zellulosenachweis. Das Material (Pilzhyphen sowohl als Bakterien) muß ohne großen Wassergehalt zur Bestimmung verwendet werden. Bakterien schwemmt man in Wasser auf und läßt einen Tropfen der Emulsion auf einem Objektträger lufttrocken werden. Pilzhyphen, die in Wasser aufgeschwemmt sind, werden durch Absaugen mit Filtrierpapier von der überschüssigen Flüssigkeitsmenge befreit. Dann setzt man eine Chlorzinkjodlösung zu, die man durch Auflösen von 30 *g* Zinkchlorid, 5 *g* Jodkalium und 1 *g* Jod in 14 $cm^3$ Wasser erhält. Zellulose wird violett gefärbt.

Mit Jod und Schwefelsäure färben sich Zellulosemembranen blau. Man verwendet eine Jod-Jodkaliumlösung, enthaltend 0·4 *g* Jod, 1·4 *g* Jodkalium in 100 Wasser, womit man die möglichst abgetrockneten Bakterien oder Pilzteile behandelt. Hierauf setzt man Schwefelsäure zu, verdünnt mit Wasser im Verhältnis von 2 Schwefelsäure auf 1 Wasser.

Kupferoxydammoniak (*Schweizer*sches Reagens) löst Zellulose innerhalb kurzer Zeit unter anfänglichen Quellungserscheinungen. Das Reagens bereitet man durch Auflösen von reinem Kupfer (Späne oder Netze) in stärkstem Ammoniak unter Luftzutritt. Die tiefblaue Flüssigkeit, die vom ungelöst bleibenden Kupfer einfach abgegossen wird,

---

[1]) *H. Behrens,* Anleitung zur mikrochemischen Analyse. 4. Heft (1895—1897).

[2]) *A. Zimmermann.* Die botanische Mikrotechnik. Laupp, Tübingen 1892. Hier zahlreiche mikrochemische Literatur.

muß entfettete Baumwolle rasch und vollständig lösen. Das Reagens hält sich nicht lange und ist vor dem Gebrauch jedesmal auf seine Lösungskraft mit entfetteter Baumwolle zu prüfen.

Konzentrierte Schwefelsäure löst Zellulose glatt. Im Beginn der Lösung tritt eine starke Aufquellung ein.

Man kann beim Nachweis der Zellulose so verfahren, daß man zuerst die Farbreaktionen mit den Jodlösungen macht, dann eine zweite Probe mit Kupferoxydammoniak behandelt, mit Ammoniak und Wasser solange wäscht, bis die Reaktion des Waschwassers neutral ist, und nunmehr mit Chlorzinkjod oder Jod und Schwefelsäure behandelt. Es darf im letzteren Falle keine violette bzw. blaue Färbung der Membran auftreten, sofern Zellulose vorgelegen hat.

Pektin-Nachweis. Derselbe wird nach Entfernung der Zellulose mit Kupferoxydammoniak vorgenommen. Das Kupferoxydammoniak wird zuerst durch Ammoniak weggespült, dann wird mit Wasser nachgewaschen und das Präparat endlich mit 1%iger Essigsäure behandelt, die ebenfalls vor der weiteren Färbung durch destilliertes Wasser verdrängt wird.

Safranin färbt in neutraler oder schwachsaurer Lösung Pektine orange. Man verwendet eine 0·5%ige Auflösung des wasserlöslichen Safranins in 0·5%iger Essigsäurelösung. Die Färbung verschwindet rasch durch Alkoholbehandlung oder in Glyzerin oder Essigsäure. Verholzte oder verkorkte Membranen bleiben dagegen bei der angegebenen Nachbehandlung längere Zeit gut gefärbt und zeigen überhaupt eine rote Farbe.

Ammoniakalisches Rutheniumsesquichlorid (Rutheniumrot) bewirkt schon in sehr verdünnten wässerigen Lösungen angewendet eine intensive Rotfärbung der Pektinstoffe und der von diesen abstammenden Schleime. Man verwendet eine 0·01—0·02%ige Auflösung in destilliertem Wasser.

Chitin-Nachweis. Chitinstoffe zeigen eine große Resistenz gegenüber von Kupferoxydammoniak, gegen Alkalien und Säuren.

Beim Chitinnachweis führt man das Chitin zuerst in Mykosin oder Chitosan über, mit dem dann die Reaktionen ausgeführt werden. Pilzhyphen erhitzt man im geschlossenen Rohre mit konzentrierter Kalilauge auf 160—180° C, kühlt dann langsam ab und untersucht in 90%igem Alkohol. Bei Zusatz von Jod-Jodkaliumlösung und stark verdünnter Schwefelsäure tritt eine rotviolette Färbung der chitinartigen Stoffe ein. Auf Zusatz von Chlorcalciumjodlösung (Wasser 4 *cm*³, Jod 0·05 *g*, Jodkalium 0·5 *g*, Chlorcalcium 16 *g*) zeigen die chitinösen Substanzen ebenfalls eine rotviolette Färbung.

Kallose ist in 1%iger Natron- oder Kalilauge leicht löslich, dagegen nicht in Wasser, Alkohol und Kupferoxydammoniaklösung. Sie zeigt ein spezifisches Verhalten zu einzelnen Farbstoffen, besonders Korallin oder Rosolsäure. Man überfärbt in einer 1%igen Auflösung von Korallin in 30%iger Sodalösung und entfärbt maximal in 4%iger Natriumkarbonat-

lösung. Untersucht wird in Glyzerin. Es entfärben sich alle Zellteile mit Ausnahme der Kallose, die stark rot tingiert bleibt.

### b) Zellinhaltsstoffe.

Trotz vielfacher Versuche existieren noch keine absolut sicheren Methoden für den Nachweis der verschiedenen Eiweißkörper in den Zellen, wenn auch durch die Anwendung gewisser Reaktionen einige von diesen mit einer gewissen Sicherheit festgestellt werden können. Die einwandfreie Untersuchung kann nur makrochemisch durchgeführt werden, wobei die in der Eiweißchemie üblichen Methoden Anwendung finden. Dieselben sind an anderen Stellen dieses Handbuches eingehend behandelt.

Die Eiweißverbindungen färben sich bei der Behandlung der frischen oder auch in Alkohol durch kurze Zeit gehärteten Zellen mit verdünnten Jod-Jodkaliumlösungen gelb und mit *Millon*schem Reagens rosenrot bis ziegelrot. Mitunter befördert die Färbung mit *Millon*schem Reagens eine geringe Erwärmung des Präparates. Das *Millon*sche Reagens[1]) stellt man sich her durch Auflösen von 1 Gewichtsteil Quecksilber in 2 Gewichtsteilen Salpetersäure (spez. Gew. 1·42) und nachherigem Verdünnen mit dem doppelten Quantum Wasser. Es ist nicht sehr lange haltbar. Die Eiweißverbindungen werden mit Pepsin-Trypsin-Gemischen bei Bruttemperatur rasch verdaut bzw. in lösliche Verbindungen übergeführt, etwas langsamer nach Fällung mit Alkohol. Man kann sich zur künstlichen Verdauung mit bestem Erfolge des Pepsin- und Pankreatinglyzerins von *Grübler* bedienen. Man mischt 1 Teil Pepsinglyzerin, 1 Teil Trypsinglyzerin mit 20 Teilen 0·3⁰/₀iger Salzsäurelösung.

Nukleine werden in 10⁰/₀iger Natriumchloridlösung und in konzentrierter wässeriger Natriumkarbonatlösung rasch gelöst. Nicht gelöst werden sie bei der Verdauung im künstlichen Magensaft bzw. in einer Mischung von 1 Teil Pepsinglyzerin Grübler, 3 Teilen Wasser und 1 Teil 0·2⁰/₀iger Salzsäure bei 40⁰ C. Zum färberischen Nachweis von Chromatin und Kernbestandteilen in der Pilz- und Bakterienzelle kann, abgesehen von der Sichtbarmachung der Teilung dieser Zellbestandteile bei der Zellteilung, was bei Bakterien nur schwierig gelingt, die Zelle vor der Färbung mit essigsaurer Methylgrünlösung einer 3—6stündigen künstlichen Verdauung in Glyzerinpepsin unterworfen werden. Man fertigt Ausstrichpräparate auf gereinigten Deckgläschen an und härtet die Präparate nach dem Trocknen in 90⁰/₀igem Alkohol. Hierauf legt man sie in das soeben genannte Gemisch von Pepsinglyzerin-Salzsäure. Stündlich entnimmt man ein beschicktes Deckgläschen, spült vorsichtig aber gründlich in Wasser und färbt mit einer 1⁰/₀igen Methylgrünlösung in 0·5⁰/₀iger Essigsäure. So erhält man die chromatische Substanz allein gefärbt. Kontroll-

---

[1]) *Plugge*, Salpetrige Säure haltiges Quecksilbernitrat als Reagens auf aromatische Körper mit einer Gruppe OH am Benzolkern. Arch. f. Pharm. Bd. 228. S. 9 (1890).

färbungen mit Methylenblau müssen vorgenommen werden, um das Verschwinden der gefällten Eiweißsubstanzen bei der Verdauung festzustellen. In einer weiteren Serie von Präparaten ist noch der Einfluß von 10%₀ Natriumchloridlösung und konzentrierter Sodalösung auf die mit Methylgrün färbbaren Zellanteile zu untersuchen, die damit größtenteils herausgelöst werden müssen, sofern es sich um Nukleinverbindungen handelt.

Von stickstoffhaltigen Zelleinschlüssen sei hervorgehoben das **Volutin** von *A. Meyer*[1]), zu dessen Nachweis folgende Reaktionen angestellt werden

Das einfach angetrocknete Ausstrichpräparat von Bakterien wird mit einer frisch bereiteten Methylenblaulösung (1 Teil gesättigte alkoholische Methylenblaulösung und 10 Teile Wasser) durch 2 Minuten bei Zimmertemperatur gefärbt. Dann wird in Wasser gespült und unter einseitiger Zwischenschaltung eines feinen Glasfadens ein Deckgläschen aufgelegt (vgl. S. 1247). Pilzhyphen werden in Wasser unter einem einseitig unterstützten Deckglas eingelegt und nach Fixierung des Deckglases Methylenblaulösung mit Filtrierpapier durchgesaugt (siehe S. 1247) und mit Wasser in derselben Weise gründlich gewaschen. Das Volutin erscheint als tief dunkelblaue, etwas gequollene, runde Masse von kleineren und größeren Körnchen. Beim Durchsaugen einer 5%igen Natriumkarbonatlösung tritt an Stelle der blauen Volutanskugeln eine helle Stelle im noch immer blaugefärbten Zytoplasma. Diese Stelle besitzt ein geringes Lichtbrechungsvermögen. Nach Waschen mit Wasser und neuerlicher Färbung mit der oben angegebenen Methylenblaulösung und Nachwaschung mit Wasser, das eine Spur Schwefelsäure enthält, erscheint das Volutin abermals dunkler gefärbt als das Protoplasma.

Ein ebenso bereitetes Trockenpräparat wird mit der angegebenen Methylenblaulösung durch 5 Minuten gefärbt. Nach Zusatz von 1%iger Schwefelsäure zu dem gewaschenen Präparat treten die Volutanskugeln stark blau gefärbt hervor.

Ein weiteres Präparat wird wieder mit Methylenblau 5 Minuten gefärbt, gewaschen und bedeckt. Beim Zufließen von Jod-Jodkaliumlösung (2 *g* Jod, 1 *g* Jodkalium, 200 $cm^3$ Wasser) bekommen die Volutansmassen eine fast schwarze Farbe. Auf weiteren Zusatz von 5%iger Natriumkarbonatlösung färbt sich das Zytoplasma wieder blau, während die Volutanskugeln verblassen. Nach dem Waschen mit Wasser und Färbung mit Methylenblau und Nachwaschen mit angesäuertem ($H_2SO_4$) Wasser treten sie wieder blau gefärbt hervor.

Kocht man das Präparat durch 5 Minuten in siedendem Wasser aus, färbt mit Methylenblau oder Karbolfuchsin und setzt dann 1%ige Schwefelsäure zu, so sind keine gefärbten Volutanskugeln mehr zu bemerken.

Durch Einlegen der Zellen in 5%ige Schwefelsäure durch 10 Minuten wird das Volutin ebenfalls gelöst und läßt sich nicht mehr

[1]) *A. Meyer*, Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. Botanische Zeitung. I. Abt. Jg. 62. S. 113 (1904).

nachweisen. Bei Nachfärbungen beobachtet man an seiner Stelle eine ungefärbte, schwachlichtbrechende Vakuole im Zytoplasma.

Durch Chloralhydratlösung (5 Chloralhydrat auf 2 Wasser) wird das Volutin in 5 Minuten nicht gelöst.

Fettlösungsmittel (Chloroform, Benzol, Äther, Alkohol, Tetrachlorkohlenstoff etc.) lösen und verändern das Volutin nicht.

**Glykogene** finden sich sowohl bei Bakterien als auch bei Pilzen und werden durch folgende Reaktionen in der Zelle nachgewiesen.

In verdünnter Jod-Jodkaliumlösung nehmen Glykogeneinschlüsse eine reine braune Farbe an. Fuchsinlösungen, Methylenblaulösungen und die Färbung nach *Gram* tingieren Glykogen nicht. Im Präparat erscheint an Stelle desselben ein heller Fleck. Durch Kochen der Präparate mit 5%iger Schwefelsäure wird das Glykogen in 3 Minuten herausgelöst. Diastase (Malzauszug) verzuckert dasselbe in 24 Stunden bei 30° C vollständig.

Der Reservestoff Granulose (Iogen *A. Meyers*) färbt sich in verdünnter Jod-Jodkaliumlösung blau, zeigt aber im übrigen das gleiche Verhalten wie das Glykogen.

Fett findet sich ebenfalls häufig in Pilzen und Bakterien. Färberisch weist man es mit Sudan- oder Gelblösung nach. Man verwendet entweder eine konzentrierte Sudanlösung in Alkohol oder eine konzentrierte Lösung von Dimethylamidoazobenzol in Alkohol. Erstere färbt Fett rot, letztere gelb. Um bessere Farbenwirkung zur Unterscheidung und Erkennung der Farbe zu haben, färbt man zuerst mit einer wässerigen Lösung von Methylenblau. Nach *A. Meyer*[1]) wird die Methylenblau-Sudanmethode folgendermaßen ausgeführt: Eine Öse des Bakterienmateriales (oder zerzupfte frische Pilzhyphen) werden mit einem Tropfen Formol auf einem Objektträger gemischt und fünf Minuten stehen gelassen. Dann setzt man einen Tropfen Methylenblaulösung (1 $cm^3$ konzentrierte alkoholische Methylenblaulösung + 40 $cm^3$ Wasser) zu und läßt weitere 10 Minuten stehen. Hierauf fügt man 1 Öse voll Sudanlösung zu, frisch bereitet durch Vermischen von gleichen Teilen konzentrierter alkoholischer Sudanlösung mit Wasser. Das Zytoplasma ist hellblau gefärbt, Vakuolen sind farblos, das Fett rosenrot bis leuchtend rot.

Die quantitative Fettbestimmung geschieht durch übliches Extrahieren mit fettlösenden Agentien, Methoden, die an anderer Stelle angegeben sind.

## B. Herstellung der Preßsäfte.

Wohl den besten Einblick in die chemische Organisation der Pilz- und Bakterienzellen bieten die aus ihnen hergestellten Preßsäfte nach dem Verfahren von *E. Buchner* und *Hahn*.[2]) Danach wird von Hefen der Preßsaft folgendermaßen hergestellt:

---

[1]) *A. Meyer*, Praktikum der botanischen Bakterienkunde. S. 87. Fischer, Jena 1903.
[2]) *E. Buchner*, *H. Buchner* und *Hahn*, Die Zymasegärung. München und Berlin 1903.

Die aus der Brauerei stammende Hefe (2 *kg*) kommt in ein Haarsieb und wird durch aufgegossenes Wasser in hohe Gefäße mit 25 *l* Inhalt gespült. Nach Absitzen der Hefe wird die darüber stehende Flüssigkeit abgezogen und durch frisches Wasser unter Umrühren ersetzt. Dieser Waschvorgang wird zwei- bis dreimal wiederholt, bis das letzte Waschwasser klar bleibt. Nun koliert man die Hefe durch ein Nesseltuch auf einem Filtrierrahmen.

Die gewaschene Hefe wird in ein beutelartig gefaltetes Koliertuch und samt diesem in ein Preßtuch gegeben. Das letztere ist ein nicht appretiertes, vor dem Gebrauche mit kaltem Wasser gründlich durchtränktes Segeltuch, das in einer hydraulischen Presse bei einem Druck von 50 Atm. vom überschüssigen Wasser befreit wird. Bei diesem Verfahren verbleiben in dem für 1 *kg* Hefe benötigten Preßtuch von 60 : 75 *cm* Größe 35—40 *g* Wasser zurück. Die gewaschene Hefe wird nun einem Druck von 50 Atm. durch 5 Minuten ausgesetzt. Danach enthält der Hefekuchen einen Wassergehalt von ungefähr 70%.

Diese entwässerte Hefe kommt hierauf in eine große Schale und wird mit einer Mischung von Quarzsand und Kieselgur gut gemischt und durch ein grobes Sieb (9 Maschen auf den Quadratzentimeter) getrieben. Der Quarzsand wird vor dem Gebrauch durch ein Sieb gesiebt, das 200 Maschen auf den Quadratzentimeter besitzt. Das Verhältnis zwischen Sand, Kieselgur oder Infusorienerde und Hefe ist:

1000 *g* entwässerte Hefe,
1000 *g* Quarzsand,
200—300 *g* Kieselgur.

Zerrieben wird dieses staubtrockene, fast weiße Pulver in Portionen von 300—400 *g* in einer Porzellanreibschale von 40 *cm* Durchmesser, die durch eine Holzfassung an einem Tische befestigt ist. Der Pistill aus Porzellan befindet sich an einer 1¾ *m* langen Eisenstange von 8 *kg* Gewicht, die in einer Öse geführt wird, welche an einem federnden Eisenband an der Wand befestigt ist. Wo sich Öse und Stange berühren, sind beide mit Leder überzogen. Es wird solange gerieben, bis die nun teigartig und graubraun gewordene Masse sich zusammenballt und von der Reibschalenwand ablöst, was für die angegebene Menge nach 2½—3 Minuten langem Zerreiben geschieht.

Zum Pressen wird die Masse entsprechend 1 *kg* Hefe in das Preßtuch eingeschlagen, dessen Zubereitung oben mitgeteilt ist. Zum Pressen bedient man sich einer hydraulischen Handpresse, wie sie z. B. auch für *Buchner* von der Maschinenfabrik Brinck und Hübner in Mannheim geliefert wurde. Sie muß einen Druck von 90 *kg* auf 1 $cm^2$ gestatten. Die in das Preßtuch eingeschlagene Masse kommt auf die Preßplatte und wird mit einem vielfach durchlochten Preßkorb aus verzinntem Stahlblech umgeben. Nun zieht man das Handrad der Presse an und hierauf die Kurbel der horizontalen Spindel, wodurch die hydraulische Presse in Tätigkeit versetzt wird. Der Druck wird soweit gesteigert, bis ein solcher von 90 *kg* auf den

Quadratzentimeter kommt. Dies entspricht einem Druck von 300 Atm., wenn die Fläche der Preßplatte 200 $cm^2$ und jene des Preßkolbens 60 $cm^2$ beträgt.

Der gewonnene Preßsaft tropft auf ein Faltenfilter und gelangt von dort in ein mit Eis gekühltes Gefäß. Die Ausbeute beträgt für 1 *kg* 320 bis 460 $cm^3$ bei der ersten Pressung. Nun wird der Preßkuchen neuerlich zerrieben und nochmals wie angegeben gepreßt.

Für die Pressung von Bakterien empfiehlt sich die Anschaffung eines kleinen Preßeinsatzes für geringere Mengen, da es schwer hält, auch mit Massenkulturen genügende Mengen Bakterienmaterial zu erhalten. Die Waschung geschieht am besten durch Filtration, indem man in einem größeren Gefäß die Bakterien in Wasser aufschwemmt und dann die Flüssigkeit durch ein Pukalfilter absaugt. Der Bakterienbrei wird dann sofort auf ein sehr dickes Filtrierpapier gebracht und dort durch die Saugwirkung desselben entwässert und nun mit Quarzsand und Kieselgur gemengt und zerrieben.

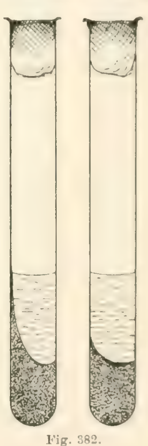
## C. Nachweis und Gewinnung einiger Enzyme von Pilzen und Bakterien.

1. Proteolytische Enzyme. Diese finden sich bei Pilzen und Bakterien sehr häufig. Man erkennt sie an der Fähigkeit, Gelatine oder koaguliertes Eiweiß in Lösung zu bringen. Man läßt die betreffenden Untersuchungsobjekte entweder unmittelbar auf eine 10%ige Leimgallerte einwirken oder von ihnen hergestellte Preßsäfte oder Auszüge. Bezüglich der Herstellung der Preßsäfte sei auf den vorhergehenden Abschnitt verwiesen. Die Auszüge werden gewöhnlich in Glyzerin oder Wasser hergestellt unter Zugabe eines Desinfektionsmittels. Als solches eignet sich vorzüglich Thymol und Toluol. Zum Nachweis sehr geringer Enzymmengen aus Bakterienkulturen versetzt man die zu prüfende Kultur zur Abtötung der Zellen mit 1% Karbolsäure und verfährt nach dem von *Schouten*[1]) angegebenen Verfahren. Hierzu benutzt man 7½%ige Gelatinelösungen in Thymolwasser.

Unmittelbar vor dem Einfüllen der Thymolgelatine wird dieselbe mit feinst pulverisiertem Zinnober versetzt und dieser in der bei niederer Temperatur verflüssigten Gelatine sehr gleichmäßig verteilt. Dann kommt von der Gelatine-Zinnoberemulsion in Proberöhrchen eine Portion von je 5 $cm^3$ und der Inhalt der beschickten Röhrchen wird in einem Wasserbad von 40° C flüssig erhalten. Sobald die gewünschte Menge von Eprouvetten gefüllt ist, werden die einzelnen Proben nach kurzem kräftigen Durchmischen je 10 Sekunden unter dem Wasserstrahl der Leitung in schräger Stellung abgekühlt und dann senkrecht gestellt erstarren gelassen. Durch die kurze Abkühlung in der Schrägstellung erstarrt die an der Eprouvettenwand befindliche Gelatine in dünner Schicht und bei der darauf folgenden

[1]) *Schouten*, Eine modifizierte Methode und ein neuer Apparat für Enzymuntersuchung. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 18. S. 94 (1907).

senkrechten Aufstellung fließt die nicht erstarrte überschüssige Gelatine ab und erstarrt dann im unteren Teil der Eprouvette. Wenn nun die Enzymlösung aufgegossen wird, bietet sich ihr eine sehr große und dünne Gelatinefläche dar, die durch den suspendierten Zinnober deutlich sichtbar ist. Selbst eine sehr geringe Lösung derselben zeigt sich dann an dem Durchsichtigerwerden der Gelatineschicht und dadurch, daß sich ein Überschuß von freigewordenem Zinnober an der untersten Stelle der Berührungsfläche zwischen Lösung und Gallerte ansammelt. In Fig. 382 sind solche nach *Schouten* hergestellte Gelatineröhrchen wiedergegeben. In der linken Proberöhre zieht sich die Zinnober-Gelatineschicht in dünner Lage hoch hinauf. Die auf proteolytische Enzyme zu untersuchende Lösung ist darüber geschichtet. Um Verdunstung hintanzuhalten, dichtet man den Watteverschluß der Röhrchen noch durch Aufgießen von Paraffin. Fig. 382 zeigt uns links das mit der auf proteolytisches Enzym zu untersuchenden Flüssigkeit überschichtete Thymolgelatineröhrchen, vergossen mit Paraffin. Die rechte Abbildung läßt erkennen, daß die an der Wand befindliche, dünne Zinnobergelatineschicht bereits herabgeflossen ist.


Fig. 382.

Für viele Zwecke eignet sich zum Nachweis von Proteasen auch die Methode der Gelatineplatten. Man gießt die Karbol- oder Thymolgelatine in Petrischalen in einer Dicke von 1—3 *mm* aus und läßt erstarren. Dann saugt man enzymhaltige Substrate, die durch eine Desinfektion mit 1—3%iger Karbolsäurelösung von allen lebenden Bakterien befreit sind, in poröse Stoffe, wie kleinste Bausteinstückchen oder Filtrierpapierstückchen auf und legt diese auf die Gelatinefläche. Dem Gehalt an Proteasen entsprechend wird um dieselben und unter denselben eine mehr oder minder große Menge der Gelatine verflüssigt. Grobe quantitative Unterschiede können damit schon festgestellt werden, für feinere Untersuchungen eignet sich diese Methode jedoch nicht. Durch Aufbewahren der beschickten Gelatineplatten in einer feuchten Kammer verhütet man auch hier die Verdunstung und Eintrocknung.

Zum Nachweis eines Elastin lösenden Enzymes bedient man sich des Verfahrens nach *Eijkman.*[1]) Das Elastin wird aus feingeschnittener Kalbslunge durch tagelanges Behandeln mit verdünnter Kalilauge und Essigsäure bei 37° C gewonnen. Nach dem Auswaschen des restierenden Elastins mit Wasser wird getrocknet und fein pulverisiert. Vor dem Gebrauch wird das Pulver in Wasser aufgeschwemmt, einer fraktionierten Sterilisation bei 90° unterzogen und nach dem Absitzen der gröberen Teilchen die

---

[1]) *C. Eijkman,* Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. 35 (1904).

darüberstehende, gleichmäßig trübe Flüssigkeit mit verflüssigtem Nähragar vermischt zu Platten verarbeitet. Auch fein zerriebenes Ligamentum nuchae und das Elastin der Arterienwand findet mit dem gleichen Ergebnis Verwendung, nur ist auf eine möglichst niedrige (80°) Sterilisierungstemperatur zu achten, um Zusammenballungen zu vermeiden. Wenn nun auf „Elastin-Agar" Mikroben in Reinkultur verimpft werden, die die Fähigkeit besitzen, ein elastinlösendes Enzym zu bilden, das in den Nährboden diffundiert, so findet um die betreffenden Kolonien herum eine Aufhellung des trüben Nährsubstrates statt. Diese ist auf eine Lösung des suspendierten Elastins zurückzuführen, wie die mikroskopische Kontrolle ergibt.

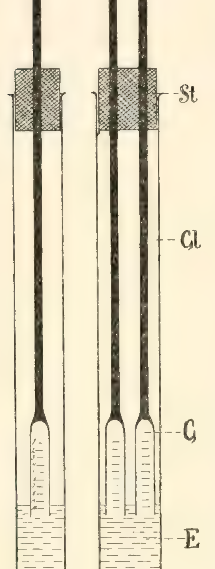


Fig. 383.

Für die quantitative Bestimmung der Proteasenwirkung dient gewöhnlich die Menge der in einer bestimmten Zeit gelösten Gelatine oder die Menge des in Lösung gegangenen Eiweißes. Für die erstere Methode eignen sich Röhrchen, wie sie von *Fuhrmann*[1]) beschrieben wurden und in Fig. 383 abgebildet sind.

In einer Proberöhre von 8—10 *mm* innerem Durchmesser ist durch einen gut passenden Korkstopfen ein Glasstab *(Gl)* verschiebbar eingesenkt, an dessen unterem Ende ein kleines Eprouvettchen *(G)* von 3—4 *mm* innerer Lichte angeschmolzen ist. Dasselbe kann eine Millimeterteilung tragen. Zweckmäßiger wird an der großen Eprouvette ein Papiermaßstab aufgeklebt. In diese große Eprouvette kommt nun die zu untersuchende Enzymlösung *E* in einer Menge von 1—2 $cm^3$. Das kleine Röhrchen wird mit Thymolwassergelatine vollständig gefüllt. Nach dem Erstaren derselben senkt man es mit dem Glasstabe solange, bis sein unteres offenes Ende ungefähr 1 *mm* in die Flüssigkeit eintaucht. Man hat nur nötig, nach bestimmten Zeiten die Verflüssigung durch Ablesen der Grenzlinie festzustellen, was in der Durchsicht gegen die Skala sehr scharf geschehen kann. Verwendet man, wie es Fig. 383 rechts zeigt, eine etwas weitere große Eprouvette mit einem zweifach gebohrten Kork, kann man zwei gleich kalibrierte Gelatineröhrchen einsenken und dann aus beiden Verflüssigungszahlen genauere Mittelzahlen rechnen. So wird jede Versuchsreihe auf bequeme Weise und vollständig exakt und unter identischen Bedingungen doppelt ausgeführt, ein gewiß nicht zu unterschätzender Vorteil.

[1]) *F. Fuhrmann,* Vorlesungen über Bakterienenzyme. S. 24. Fischer, Jena 1907. — Dort noch eine Reihe anderer Methoden.

Bei der zweiten Methode zur quantitativen Bestimmung der Wirkung proteolytischer Enzyme verwendet man Fibrin, erstarrtes Blutserum, koaguliertes Hühnereiweiß u. dgl. als Reagens. Man hat in diesem Falle nur nötig, nach den üblichen Stickstoffbestimmungsmethoden die Menge des Stickstoffs der gelösten Stickstoffverbindungen vor und nach dem Versuche zu bestimmen. Aus der Zunahme derselben während der Enzymwirkung kann auf die Größe der letzteren geschlossen werden.

Für die Gewinnung von Enzymen aus Hyphomyzeten und für die Untersuchung derselben ohne Zusatz von desinfizierenden Agenzien hat

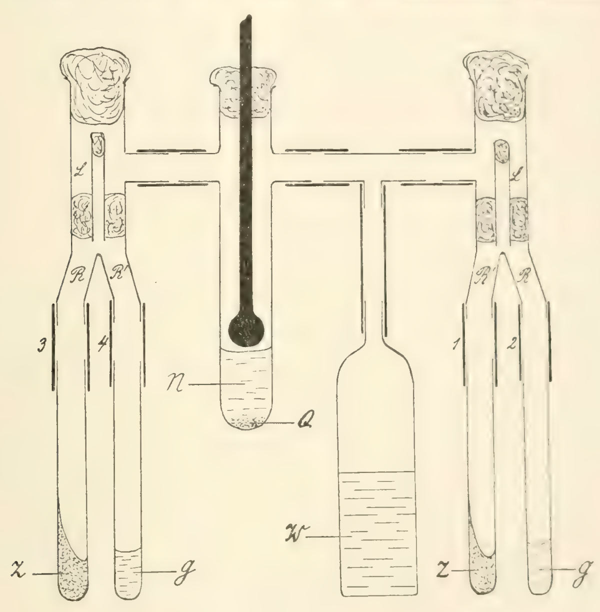



Fig. 384.

*Schouten*[1]) einen Apparat konstruiert, dessen Einrichtung aus Fig. 384 hervorgeht, die uns denselben im Durchschnitt zeigt. Das Kulturglas für die Pilze hat zwei seitliche Rohransätze, ist oben mit einem Wattebausch verschlossen, durch den der in der Zeichnung schwarz gehaltene Glasstab hindurchgeht. Er besitzt am Ende eine kugelige Erweiterung. An den linken Rohransatz schließt sich eine Röhre, die unten in zwei engere Glasrohre mündet (*R* und *R'*). Die Röhre ist ebenfalls oben mit einem Watteverschluß versehen und besitzt im Innern ein Wattefilter, durch das ein ebenfalls

[1]) *S. L. Schouten*, Eine modifizierte Methode und ein neuer Apparat für Enzymuntersuchung. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **18**. S. 95 (1907).

mit Watte abgeschlossenes Röhrchen *L* hindurchgeht. An den rechten Rohransatz des Kulturgefäßes schließt sich ein **T**-Stück, an das eine kleine Flasche mit Wasser *(W)* angehängt ist, und ein zweites Rohr von derselben Beschaffenheit, wie auf der linken Seite. An die Rohransätze *R* und *R'* passen kleine Eprouvetten, die mit dem Reagens auf Enzym gefüllt sind. In unserem Falle jederseits ein Röhrchen mit schräg erstarrter Zinnobergelatine *(z)* und gerader erstarrter Gelatine *(g)*, denen aber kein Desinfektionsmittel zugesetzt ist, sondern die durch Dämpfen keimfrei gemacht worden waren. Beim Gebrauch verfährt man folgendermaßen: Nachdem mittelst dickerer Kautschukschläuche die einzelnen Apparatteile zusammengefügt worden sind, füllt man in das Kulturrohr die Nährlösung *(N)* und ungefähr 1 *g* feinsten Quarzsand *(Q)*. Dann verschließt man mit dem Wattebausch. Nun füllt man in die Waschflasche Leitungswasser *(W)* und schließt sie ebenfalls an. Hierauf fügt man die Proberöhrchen mit den Gelatinen an, von denen je eine mit Zinnober versetzt ist. Nach der letzten Erwärmung bei der üblichen diskontinuierlichen Sterilisation läßt man die Zinnobergelatine in der auf S. 1254 angegebenen Weise erstarren und benutzt die Nährlösung mit dem zu untersuchenden Fadenpilz.

Nachdem sich der Pilz genügend entwickelt hat, was wegen der angehängten Röhrchen mit Gelatine nicht bei Temperaturen über 20° C geschehen darf, benetzt man mit Wasser aus *W* das Wattefilter des rechten Ansatzes, neigt sehr vorsichtig das Kulturröhrchen seitlich so weit, daß die Nährflüssigkeit durch das **T**-Stück hindurch, ohne in die Waschflasche zu gelangen, in den rechten Ansatz kommt, das Wattefilter passiert und durch die Rohre *R* und *R'* in die Gelatineröhrchen gelangt. Nunmehr werden die Verbindungsschläuche *1* und *2* mit Quetschhähnen abgeklemmt und dann von den Rohren *R* und *R'* abgezogen. Hierauf wäscht man die Pilzkultur, indem man aus der Waschflasche *W* Wasser zufließen läßt, umschüttelt und das Waschwasser wieder durch den rechten Ansatz abfließen läßt. Die Waschung wird solange durchgeführt, bis das Waschwasser völlig klar abläuft. Nunmehr gibt man noch eine Portion Wasser auf die Pilzkultur und läßt dieses nach links zur Benetzung des Wattefilters im linken Rohransatz abfließen. Nun zerreibt man das Pilzmyzel mit dem knopfförmigen Ansatz des Glasstabes und dem Quarzsand. Nach sorgfältigem Zerreiben laugt man mit Wasser aus und filtriert den Extrakt durch das linke Wattefilter in die Proberöhrchen mit dem Enzymreagens. Hierauf werden die Schläuche *3* und *4* abgeklemmt und von den Röhrchen *R* und *R'* abgenommen. Die mit Watte verschlossenen Röhrchen *L* sind als Auslaß für die Luft bei der Filtration eingesetzt. Will man nur die Kulturflüssigkeit verwenden, so unterbleibt selbstverständlich die Einführung des Glasstabes und des Quarzsandes für die Zerreibung.

*Conns* [1]) Methode zum Labnachweis in Bakterienkulturen: Die Mikroorganismen werden in sterilisierter Milch gezüchtet. Nach 8—10 Tagen nach dem Gerinnen der Milch wird destilliertes Wasser in geringer Menge

---

[1]) *H. W. Conn*, Isolierung eines Labfermentes aus Bakterienkulturen. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. 12. S. 323 (1892).

zugesetzt, gut geschüttelt und die Kultur durch ein Porzellanfilter filtriert. Das Filtrat wird weiter nach der *Blumenthal*schen Methode der Labpepsintrennung behandelt. Dementsprechend wird dasselbe mit 0·1%iger Schwefelsäure schwach angesäuert und mit einem Überschuß von Kochsalz versetzt, so daß ein ungelöster Salzrückstand verbleibt. Es scheidet sich an der Oberfläche ein schneeweißer Schaum ab, der ein verhältnismäßig reines Lab darstellt. Dieses wird in Wasser gelöst und durch Dialyse salzfrei gemacht. Die Labwirkung prüft man auf Milch oder Kaseinlösungen mit geringem Kalkzusatz.

2. Kohlenhydratspaltende Enzyme. Diese werden in Lösungen oder in Kulturen entweder mit der Diffusionsmethode nach *Wysmann* oder mittelst der Auxanographie *Beijerincks* nachgewiesen.

Diffusionsmethode *Wysmanns*[1]): Da hier nicht lebende Organismen das Reagens sind, kann bei dieser Methode mit desinfizierten Enzymlösungen gearbeitet werden. Gelatineplatten werden mit dem zu untersuchenden Kohlenhydrat durchsetzt und mit einem Tröpfchen der Enzymlösung beschickt. Aus dem Tröpfchen diffundiert das Enzym in die Gelatineplatte und bewirkt in dem darin gelösten oder suspendierten Kohlenhydrat die Veränderungen. Wird nachher die Platte mit einem Reagens übergossen, das Farbenreaktionen mit dem ursprünglichen oder mit den entstandenen Produkten auslöst, so treten besonders gefärbte Diffusionsfelder auf. War beispielsweise in der Platte Stärke suspendiert und wurde Amylaselösung aufgetropft, so wird nach einiger Zeit durch aufgegossene Jodlösung die unveränderte Stärke mit Blaufärbung reagieren, die Platte also überall dort, wo keine Veränderung der Stärke statthatte, blau sein, während die Gelatine um den Amylasetropfen farblos bleibt. Bei der Bildung sich anders färbender Spaltungsprodukte werden Mischfarben entstehen, die zonenartig den Ausgangspunkt der Enzymwirkung umgeben.

Bei der Untersuchung der bakteriellen kohlenhydratspaltenden Enzyme können die angeführten Methoden mit geringen Modifikationen mit Vorteil angewendet werden.

Auxanographie[2]): Empfindliche, qualitative Reagenzien auf eine Reihe von Spaltungsprodukten der enzymatischen Kohlenhydratzerlegung sind gewisse niedere Organismen selbst. So vermögen bestimmte Hefearten nur dann sich zu entwickeln, wenn ganz bestimmte Zuckerarten vorhanden sind, während mit anderen Kohlenhydraten jedes Wachstum unterbleibt. Diese bei Mikroorganismen weitverbreitete auswählende Fähigkeit benutzte *Beijerinck* zur Ausarbeitung der auxanographischen Methode, die für die Untersuchung der qualitativen Verhältnisse der Kohlenhydratspaltung gute Dienste leistet. Als Nährboden für die Versuche verwendet *Beijerinck* folgende Gelatine:

---

[1]) *Wysmann,* De diastase beschouwed als mengsel van Maltase en Dextrinase. Amsterdam 1889.

[2]) *Beijerinck,* Über Nachweis und Verbreitung der Glukase, das Enzym der Maltose. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 1. S. 221 (1895).

Gelatine . . . . . . . 100 $g$
Monokaliumphosphat . . 0·5 $g$
Chlorammonium . . . . 0·5 $g$ (oder Pepton sicc. 10 $g$ oder Asparagin 5 $g$[1])
Leitungswasser . . . . 1000 $cm^3$

Zugesetzt wird dann noch 0·5—5% von dem Kohlenhydrat, das auf seine Spaltung untersucht werden soll und von der verwendeten Hefe nicht unmittelbar assimiliert werden kann (von löslicher Stärke 0·5%, von den Sacchariden bis zu 5%). Der in Eprouvetten ausgefüllte und verflüssigte Nährboden wird mit der entsprechenden Hefeart bei 32—37° C vermischt und die eingesäten Zellen durch vorsichtiges Umschwenken gut verteilt. Dann gießt man in sterilisierte Petrischalen aus, die einen gleichmäßig ebenen Boden besitzen, und läßt in horizontaler Lage rasch erstarren. Die enzymhaltige Flüssigkeit, die in diesem Falle steril sein muß und kein Desinfektionsmittel enthalten darf, kann man in kleinen Tröpfchen auf die Gelatine bringen oder sie in kleine Stückchen von sterilem Filtrierpapier aufsaugen und diese auflegen. Zur Kontrolle empfiehlt sich die gleichzeitige Verimpfung von vorher aufgekochter enzymhaltiger Flüssigkeit. Wenn nun die auf die Platten gebrachte Enzymlösung ein Enzym enthält, das das in der Platte vorhandene Kohlenhydrat in eine für die verwendete Hefenart assimilierbare Zuckerart spaltet, findet im Umkreis eine Trübung der Gelatine statt, hervorgerufen von den auswachsenden Kolonien der eingeführten Hefe. Die erhitzte Enzymlösung darf kein Wachstum auslösen.

*Beijerinck* untersuchte eine Reihe von Saccharomyceten und Mycodermen auf ihr auswählendes Verhalten gegen verschiedene Kohlenhydrate. In der folgenden Tabelle sind einige Typen nach dem genannten Autor zusammengestellt.

| Nr. | Bezeichnung | Dextrose | Lävulose | Saccharose | Laktose | Maltose | Dextrin |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | Glukosehefen (Saccharomyces apiculatus usw.) | + | + | — | — | — | — |
| II | Saccharosehefen (Saccharomyces fragrans usw.) | + | + | + | — | — | — |
| III | Maltosehefen (Saccharomyces cerevisiae, S. ellipsoideus usw.) | + | + | + | — | + | — |
| IV | Laktosehefen (Saccharomyces Kefir, S. Tyrocola usw.) | + | + | + | + | — | — |
| V | Polysaccharosehefen (Saccharomyces acetaethylicus usw.) | + | + | + | — | + | + |

Das +-Zeichen bedeutet, daß die Hefegruppe das betreffende Kohlenhydrat assimiliert; das —-Zeichen, daß dieses Kohlenhydrat nicht assimilierbar ist.

[1]) Richtet sich nach der verwendeten Hefe, z. B. Pepton oder Asparagin bei Saccharomyces apiculatus, S. fragrans oder S. Kefir. Sonst $ClNH_4$.

Amylasenachweis: Nach der auxanographischen Methode verfährt man in der Weise, daß man die oben genannte Gelatine herstellt und lösliche Stärke in einer Menge von 0·5% zusetzt. Hierauf beimpft man eine Gelatineprobe bei 32° C mit einer Glukosehefe, z. B. Saccharomyces apiculatus, eine zweite mit einer Polysaccharosehefe, z. B. Saccharomyces acetaethylicus. Nach gleichmäßiger Verteilung der Hefenzellen im Substrat gießt man die Platten in *Petri*sche Schalen und läßt rasch erstarren. Jetzt bringt man Tröpfchen des Kulturfiltrates, das auf Amylase zu untersuchen ist, auf die Platten oder verimpft direkt Mikroorganismen darauf. Im Umkreis desjenigen Tröpfchens, das Amylse enthält, wird zumindest die Polysaccharosehefe anwachsen, wenn die Spaltung in Dextrin erfolgt ist. Findet eine tiefere Spaltung bis zu Glukosen statt, dann wird auch in der ersten Platte Wachstum der Glukosehefe eintreten.

Mit der Diffusionsmethode gelingt der Nachweis ebenfalls leicht, wie auf S. 1259 angegeben ist.

Für den Nachweis von Amylase bei Bakterien, die nur bei Bruttemperatur gedeihen, ist die Gelatineplatte natürlich nicht zu gebrauchen. Hier suspendiert man nach dem Vorgange von *van Senus* und *Eijkman*[1]) Stärke in Agarplatten und verimpft darauf Striche oder Punkte mit der zu untersuchenden Bakterienart oder Pilzart. Bei der Produktion von diffundierender Amylase wird der Nährboden im Umkreise der entstehenden Kolonien dadurch aufgehellt und durchsichtig, weil die Stärke in lösliche Verbindungen aufgespalten wurde.

Gelasenachweis nach *Gran*[2]): Verwendet wird ein Nähragar, der 1·5% Agar, 3% Kochsalz, 1% Pepton und 0·1% Monokaliumphosphat enthält, eine schwach alkalische Reaktion aufweist und mit Lackmus oder Azolithmin schwach gefärbt wird. Das Nährsubstrat wird verflüssigt und bei 40° C mit Bacillus phosphorescens Beijerinck gleichmäßig beimpft. Hierauf werden Platten gegossen und dieselben nach dem Erstarren auswachsen gelassen. Nach 3 Tagen, nach welcher Zeit die Platten nur kaum mehr leuchten, wird darauf die Bakterienart in Form von Strichen verimpft, die auf die Fähigkeit der Agarhydrolyse untersucht werden soll. Enthält die Bakterienart ein solches Enzym, so entstehen innerhalb kurzer Zeit um die Impfstriche leuchtende Felder.

Der Nachweis von fettspaltenden Eigenschaften bei Pilzen und Bakterien gelingt leicht nach der Methode von *Eijkman* (l. c.). Danach wird der Boden von *Petri*schen Schalen mit einer dünnen Schicht von Fett, vornehmlich Rindertalg, bedeckt. Darüber wird mit dem noch flüssigen Agar eine Platte gegossen, auf die die zu untersuchenden Bakterien verimpft werden. In Agar diffundierende Lipasen zersetzen dann den Talg

---

[1]) *Eijkman*, Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. **29** (1901).

[2]) *H. H. Gran*, Studien über Meeresbakterien. II. Über die Hydrolyse des Agar-Agars durch ein neues Enzym, die Gelase. Bergens Museum, Aarbog. Heft 1 (1902).

in charakteristischer Weise. Es entstehen dort weiße, kreidige, undurchsichtige Flecke, die mit dem abgehobenen Agar mitgehen. Der Talg wird verseift, wobei vornehmlich Kalkseifen und wenig Natron- und Ammoniakseife gebildet wird. Dieses Verfahren kann auch für anaërob wachsende Bakterien verwendet werden. Man hat die beimpften Schalen nur entweder in den auf S. 1242 angegebenen Anaërobenzüchtungsapparat zu stellen oder in dem für konstanten Wasserstoffstrom eingerichteten, auf S. 1245 beschriebenen Apparat unterzubringen.

## D. ANHANG.

Als Anhang sei noch die Gewinnung der Farbstoffe der Purpurbakterien hier angeführt.

Das Bakteriopurpurin besteht aus zwei Farbstoffen, die nach *Molisch*[1]) folgendermaßen aus den Purpurbakterien erhalten werden: Der Bodensatz von Massenkulturen der Purpurbakterien wird durch Abheben der darüberstehenden Flüssigkeit auf ein Filter gebracht und möglichst wasserarm gemacht. Es ist darauf zu achten, daß die Purpurbakterien nicht weggeschwemmt werden. Die auf dem Filter befindliche Purpurbakterienmenge wird dann mit starkem Alkohol übergossen und durch Erneuerung des grüngefärbten Alkoholes vollständig ausgezogen. Auf diese Weise erhält man den grünen Farbstoff des Bakteriopurpurins, das Bakteriochlorin. Der nunmehr rotbraune und mißfarbig aussehende Rückstand wird weiter mit Chloroform oder Schwefelkohlenstoff extrahiert. Man erhält je nach den verwendeten Purpurbakterien eine orangerote, eine hellkarminrote bis granatrote Lösung, die den roten Farbstoff des Bakteriopurpurins, das eigentliche „Bakteriopurpurin" enthält. Das Bakteriochlorin kristallisiert aus seinen Lösungen nicht, wohl aber das „Bakteriopurpurin".

Mikroskopisch kann man sich von der Anwesenheit beider Farbstoffe in Purpurbakterien dadurch überzeugen, daß man eine Flocke der Bakterien auf einem Objektträger eintrocknen läßt, dann mit einem Deckglase bedeckt, das einseitig unterlegt ist. In den keilförmigen Raum läßt man absoluten Alkohol einströmen. Beim Verdunsten des Alkohols bleibt der grüne Farbstoff in Form grüner Tropfen zurück, während sich daneben kleine rote Kriställchen des roten Farbstoffes zeigen.

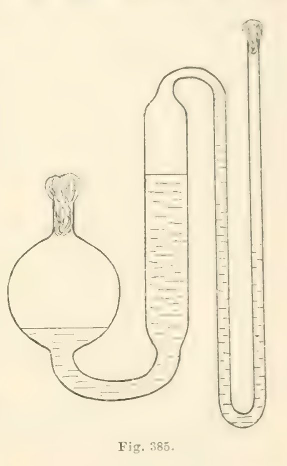
# VI. Methoden zum Nachweis und zur Bestimmung einzelner Umsetzungsprodukte in Pilz- und Bakterienkulturen.

### a) Nachweis gasförmiger Umsetzungsprodukte.

Der Nachweis von gasförmigen Umsetzungsprodukten geschieht am einfachsten durch die Zucht in Gärungskölbchen. Als solche verwendet

[1]) *H. Molisch,* Die Purpurbakterien. G. Fischer, Jena (1907).

*Fuhrmann* [1]) Kulturgefäße von der Form der Fig. 385. Die Kugel faßt ungefähr 25 *cm*³. Die weite Röhre, welche als Gassammelgefäß dient, hat ebenfalls einen Rauminhalt von ungefähr 25 *cm*³. An das Sammelgefäß ist ein **U**-Rohr angeschmolzen, welches als Verschluß dient, sobald das Kulturgefäß mit Nährflüssigkeit angefüllt ist. Sowohl das offene Rohr der Kugel als auch das **U**-Rohr sind mit einem Wattebausch verschlossen. Die Füllung dieses Kulturgefäßes ist sehr einfach. Man füllt das kugelige Gefäß bis zum Ansatzrohr für den Wattebausch voll und saugt dann mit einem an das **U**-Rohr über den Watteverschluß angesetzten Schlauch die Nährflüssigkeit in das Gassammelgefäß und in das **U**-Rohr. Dann wird durch drei Tage diskontinuierlich im Dampftopf sterilisiert und die zu untersuchenden Mikroorganismen in die Kugel verimpft. Sobald die erste Gasblase aufsteigt, wird die Flüssigkeit in zwei Teile getrennt, die als Sperrflüssigkeit für beide Rohre (**U**-Rohr und Kugel) dienen.


Fig. 385.

Für den einfachen Nachweis einer Gasbildung durch Bakterien kann auch die „Schüttelkultur" verwendet werden. Als Nährboden dient Nähr-Gelatine oder -Agar mit einem Zusatz von 1% Dextrose. Die zu untersuchende Bakterienart wird in den verflüssigten Nährboden eingeimpft und darin durch Schütteln gleichmäßig verteilt. Dann wird in Eiswasser die Nährgallerte zum raschen Erstarren gebracht. Vermag die Bakterienart den Traubenzucker unter Gasentwicklung zu spalten, so ist schon nach 24 Stunden der ganze Nährboden von zahlreichen kleinen Gasbläschen durchsetzt.

Zum qualitativen Nachweis von Schwefelwasserstoffbildung bringt man in das Röhrchen ein Stückchen Filtrierpapier, das mit einer Lösung von basisch-essigsaurem Blei getränkt ist. Durch den Wattebausch wird das Streifchen an der Wand festgeklemmt. Schwefelwasserstoffbildung bedingt Schwärzung des Papieres.

In Plattenkulturen erkennt man die Schwefelwasserstoff erzeugenden Organismen durch Anwendung des Verfahrens von *Beijerinck* [2]), der „Bleiweißprobe". Zu Nähragar oder Nährgelatine kommt soviel Bleikarbonat, daß die Portion schneeweiß ist. Dann wird der so vorbereitete Nährboden zu Platten in Petrischalen verarbeitet. Diese Platten müssen

[1]) *F. Fuhrmann*, Zur Kenntnis der Bakterienflora des Flaschenbieres. Zentralbl. f. Bakt. 2. Abt. Bd. 19. S. 117 (1907).

[2]) *M. W. Beijerinck*, Schwefelwasserstoffbildung in den Stadtgräben und Aufstellung der Gattung Aërobacter. Zentralbl. f. Bakt. 2. Abt. Bd. 6. S. 193 (1902).

ebenfalls ein schneeweißes Aussehen haben. Nach dem Erstarren derselben wird darüber die mit sterilisiertem Wasser verdünnte Bakterienprobe gegossen und weiterhin bei Zimmer- oder Bruttemperatur, entsprechend dem Temperaturoptimum der zu untersuchenden Bakterienart, weitergezüchtet. Alle von sulfidbildenden Bakterien angegangenen Kolonien sind infolge des abgeschiedenen Schwefelbleies braun. Von anderen Bakterienarten erzeugte Auflagerungen sind ungefärbt.

Für die quantitative Analyse von gasförmigen Umsetzungsprodukten der Bakterien und Pilze ist die Aufsammlung größerer Gasmengen notwendig. Hierzu kann das Kulturgefäß von *Fuhrmann* (S. 1263) in größerer Ausführung verwendet werden. In diesem Falle genügen Gefäße, deren Sammelraum 250 *cm*³ Inhalt hat. Die Kugel muß natürlich den gleichen Fassungsraum besitzen. Von dem Sammelgefäß wird das Gas in die Meßgefäße oder Absorptionsgefäße nach *Hempel* dadurch übergeführt, daß man das angesetzte **U**-Rohr mit Sperrflüssigkeit vollständig füllt, dann einen Kautschukschlauch ansetzt und die Verbindung bis zum Analysengefäß weiterführt, so daß eine ununterbrochene Sperrflüssigkeitsverbindung hergestellt ist. Dann setzt man einen zweiten Schlauch mit einem Trichter an den Rohransatz des Kugelgefäßes an und füllt Wasser nach, dem man beim Arbeiten mit pathogenen Mikroorganismen ein Desinfektionsmittel zusetzt. Durch Ansaugen von seiten der Analysengefäße tritt dann das Gas über.

Bezüglich der Ausführung von Gasanalysen sei auf den Anhang zum intermediären Stoffwechsel im III. Bande des Handbuches verwiesen.

### b) Nachweis gelöster Umsetzungsprodukte.

Indolnachweis nach *Ehrlich* für bakteriologische Zwecke von *A. Böhme.* [1])

Dazu werden folgende Stammlösungen benutzt:

1. Paradimethylamidobenzaldehyd 4
   Alkohol (96%ig) 380
   konzentrierte Salzsäure 80
2. Kaliumpersulfat in gesättigter wässeriger Lösung.

Die Kulturen der auf Indolbildung zu untersuchenden Mikroben werden in Nährbouillon gezüchtet und zur Untersuchung eintägige Kulturen verwendet.

Zu ungefähr 10 *cm*³ Bouillonkultur werden 5 *cm*³ der Lösung 1 und 5 *cm*³ der Lösung 2 zugefügt und das Gemisch stark geschüttelt. Sofort oder innerhalb weniger Minuten tritt eine intensive Rotfärbung auf, wenn viel Indol vorhanden ist. Die Raschheit des Eintrittes der Rotfärbung ist bedingt durch die Menge des gebildeten Indols. Der entstandene Farbstoff kann aus der Flüssigkeit durch Amylalkohol ausgezogen werden,

[1]) *A. Böhme,* Die Anwendung der *Ehrlich*schen Indolreaktion für bakteriologische Zwecke. Zentralbl. f. Bakt. 1. Abt. Orig. Bd. **40**. S. 129 (1906).

indem man sie damit schüttelt. Eine Beobachtungsdauer von 5 Minuten genügt für alle Fälle.

Zu dieser Reaktion sei bemerkt, daß sich auch andere Derivate des Indols, wie Skatol, Skatolaminoessigsäure, bei Verwendung konzentrierter Säure mit dem Dimethylamidobenzaldehyd kondensieren und zur Bildung rotgefärbter Verbindungen führen. Zur Vermeidung dessen ist die obige Vorschrift genau einzuhalten, da die genannten Substanzen unter diesen Bedingungen nach vorübergehender Rotfärbung eine intensive, aber flüchtige blaue Farbe geben.

Nitritnachweis.

Derselbe wird ausgeführt, indem man die flüssige Kultur (10 $cm^3$) mit 1 $cm^3$ frisch bereiteter Jodkalistärke versetzt und mit verdünnter Schwefelsäure (10%ig) ansäuert. Eintretende Blaufärbung zeigt die Anwesenheit von Nitriten an. Immer ist die Kontrolle dadurch zu machen, daß man an Stelle der Kulturflüssigkeit zuerst destilliertes Wasser mit Jodkalistärke und Schwefelsäure versetzt und überdies die sterile Nährflüssigkeit ebenso prüft, wobei keine Blaufärbung auftreten darf. Verfasser verwendet immer einen 1%igen Stärkekleister mit 1% Jodkaliumzusatz. (Siehe auch Nitrifikationsmikroben, S. 1315.)

Nachweis von Säurebildung durch Mikroben nach *Beijerinck.*[1])

Hierzu wird ein Nährboden benutzt, der frisch geschlemmtes Calciumkarbonat enthält. Man verwendet einfach Nähragar oder Nährgelatine. Vor der Sterilisation setzt man so viel Schlemmkreide zu, bis der Nährboden stark milchig getrübt ist und vollständig weiß erscheint. Hierauf gießt man damit Platten in sterile Petrischalen. Die zu untersuchende Bakterienart oder das bakterienhaltige Substrat wird in sterilem Wasser genau so verteilt, wie es für die Verdünnungen beim Gelatineplattenguß angegeben ist. Nur nimmt man statt 3 Ösen 10—15 Ösen und gibt von Haus aus mehr Material in das Original. Die erhaltenen Verdünnungen werden über die erstarrten Platten gegossen und der Überschuß wieder in eine Desinfektionsflüssigkeit abgegossen. Der benetzte Schalenrand wird mit einem in 70%igen Alkohol getauchten und gut ausgedrückten Wattebausch gereinigt. Hierauf kommen diese „Übergußplatten" in den Thermostaten mit 22° C, wenn mit Gelatine gearbeitet wurde, in einen solchen mit 33° C, wenn Agar verwendet wurde. Man erkennt die aus säurebildenden Bakterien zusammengesetzten Kolonien sofort daran, daß um die betreffende Kolonie eine durchsichtige Zone entstand, sofern die produzierte Säure eine lösliche Calciumverbindung einzugehen vermag. Wie beistehende Fig. 386 zeigt, sind die hellen Diffusionsfelder sehr regelmäßig um die Kolonie angeordnet. Eine Störung zeigt sich sofort, wenn sich im Bereich des Diffusionsfeldes der Säure eine alkalienbildende Kolonie befindet, wie

---

[1]) *M. W. Beijerinck,* Verfahren zum Nachweise der Säureabsonderung bei Mikrobien. Zentralbl. f. Bakt. 1. Abt. Bd. 9. S. 781 (1891).

es *a* der Fig. 386 zeigt. Soweit der Diffusionskreis des Alkalis geht, findet keine Aufhellung statt bzw. bemerkt man am aufgehellten Hof einen undurchsichtigen Teil. Auf diese Weise läßt sich mit dem genannten Kreidenährboden auch eine alkalibildende Bakterienart neben anderen erkennen.

Zur Erkennung von Säure- und Alkalibildung in Kulturen kann man das Nährsubstrat unmittelbar mit einem farbigen Indikator versetzen, an dessen Farbenänderung die Reaktion des Nährstoffes während des Wachstums der Mikroben jederzeit ermittelt werden kann. Zu diesem Zwecke eignet sich vor allem Lackmustinktur und Azolitminlösung. Von letzterer wird dem betreffenden Nährsubstrat soviel vor der Sterilisation zugesetzt, bis eine gut wahrnehmbare ausgesprochene Färbung auftritt.

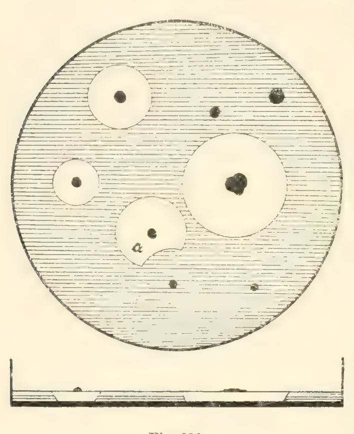



Fig. 386

Bestimmung der Säure- und Alkalimenge in flüssigen Kulturen.

Diese Bestimmungen werden titrimetrisch ausgeführt und haben nur dann einen Wert, wenn die Kulturen in ganz bestimmter Weise angelegt und gezüchtet werden. Zuerst überzeugt man sich durch eines der früher angegebenen Verfahren, ob Säure- oder Alkalibildung vorliegt.

1. Man verwendet zur Zucht ein kontrollierbares flüssiges Nährsubstrat, und zwar das einfachste, auf dem der zu untersuchende Pilz oder die zu bestimmende Bakterienart noch gut gedeiht.

2. Man verimpfe immer eine größere Menge Materiales, die annähernd genau gemessen ist, wozu man Ösen von 2 *mm* Durchmesser benutzt.

3. Man nehme zur Anlegung von Kulturen für Bestimmungen der Säure- oder Alkalibildung nur junges, üppig wachsendes Material. Bei Bakterien geht man von 12stündigen, beim Temperaturoptimum gewachsenen Kulturen aus.

4. Die Zuchten werden in genau gleichen Kölbchen ausgeführt, die alle eine gleich große Öffnung besitzen, um überall dieselben Luftzutrittsbedingungen herzustellen. Für alle Zuchten wird eine gleiche Quantität Nährflüssigkeit, am besten 50 $cm^3$, verwendet.

5. Die Kulturen werden bei der gleichen Temperatur gehalten bzw. sollen keine Schwankungen während der Dauer des Versuches auftreten.

6. Von der zu untersuchenden Mikroorganismenart werden sechs gleiche Kulturen von dem gleichen Impfmaterial angelegt und unter vollständig gleichen Züchtungsbedingungen gehalten.

7. Je zwei Kulturen werden nach 6, nach 12 und 24 Tagen untersucht.

Als Indikator für Säurebestimmungen verwendet man am besten nach *A. Meyer*[1]) eine Lösung von 0·5 *g* Rosolsäure in 50 *cm*³ Alkohol, die mit dem gleichen Volumen destillierten Wassers verdünnt wird.

Der Indikator für die Titrierung der Basen ist eine Auflösung von 0·05 *g* Dimethylamidoazobenzol in 100 *cm*³ 96⁰/₀igem Alkohol (nach *A. Meyer*[1]).

Bei Kulturen von säurebildenden Mikroorganismen bestimmt man den Titer auf folgende Weise. Man mißt in ein kleines Bechergläschen mit einer genauen Pipette 10 *cm*³ des verwendeten sterilen Nährsubstrates und in ein gleich großes Bechergläschen 10 *cm*³ destillierten ausgekochten Wassers. In jede Portion kommen je 3 Tropfen der Rosolsäurelösung (Indikator). Hierauf bestimmt man den Titer der sterilen Nährflüssigkeit durch Zusatz von $^1/_{10}$ Normalnatronlauge bzw. $^1/_{10}$ Normal-Schwefelsäure, die man aus einer Bürette zufließen läßt. Die Vergleichsprobe mit destilliertem Wasser, der noch 1 Tropfen $^1/_{10}$ Normalnatronlauge zugesetzt wird, ist, auf einer weißen Porzellanplatte stehend, in der Nähe zu halten. Man titriert durch entsprechende Zugabe von Alkali soweit, bis das Rot der neutralen Vergleichsprobe erreicht ist. Diese Titrationen sollen immer bei Tageslicht ausgeführt werden. Nun notiert man den Titer der ursprünglichen, zur Kultur verwendeten Nährflüssigkeit, indem man die zur Herstellung der Farbengleichheit verwendeten Mengen von Säure und Alkali voneinander subtrahiert und die Differenz anmerkt.

Hierauf gießt man die zu untersuchende Kultur in einen Meßkolben von 50 *cm*³ Inhalt und ersetzt die verdampfte Menge Wasser, indem man mit sehr kleinen Portionen von destilliertem Wasser das Kulturglas ausspült und bis zur Marke damit auffüllt. Nach Durchmischung der Kulturflüssigkeit filtriert man durch gehärtetes Filtrierpapier und entnimmt 10 *cm*³ Filtrat, das in ein gleiches kleines Bechergläschen gegeben wird, wie es für die Vergleichsprobe oben genommen wurde. Nunmehr versetzt man die Probe mit 3 Tropfen Rosolsäurelösung, notiert den Stand von Säure und Alkali in den Büretten und fügt solange Säure und Alkali zu, bis die Farbe der Vergleichsprobe erreicht ist. Die Differenz der zweiten Ablesung ergibt den Säuregrad in 10 *cm*³ Kulturflüssigkeit, ausgedrückt in Kubikzentimetern $^1/_{10}$ Normalnatronlauge. Wir bezeichnen sie mit D. Jetzt muß noch der ursprüngliche Säure- bzw. Alkaligehalt der verwendeten Nährflüssigkeit in Rechnung gesetzt werden. War der Nährboden sauer, muß diese Säuremenge abgezogen werden; war er alkalisch, so ist diese Zahl hinzuzufügen. Wir bezeichnen sie mit + d und − d, entsprechend einem alkalischen oder sauren Nährsubstrat. Hierauf rechnen wir den Säuregehalt noch auf 100 *cm*³ Kulturflüssigkeit um, indem wir die erhaltene Zahl mit 10 multiplizieren. Demnach ergibt sich nach unserem Verfahren ein wahrer Säuregehalt in

[1]) *A. Meyer*, Praktikum der botanischen Bakterienkunde. Jena. S. 96 u. f. (1903).

100 $cm^3$ Kultur = (D + d) . 10 oder = (D — d) . 10, entsprechend einem ursprünglich alkalischen oder sauren Nährboden. Man mache es sich zur Regel, mehrere Titrationen mit verschiedenen Portionen derselben Kulturflüssigkeiten auszuführen und das arithmetische Mittel der erhaltenen Werte zu verwenden.

Der Alkaligehalt von Kulturen wird folgendermaßen bestimmt:

Zuerst bestimmt man den Titer der verwendeten sterilen Nährflüssigkeit, indem man 10 $cm^3$ unter Zusatz von 3 Tropfen Dimethylamidoazobenzollösung titriert. Wieder stellt man sich in einem gleich großen Bechergläschen mit 3 Tropfen dieses Indikators in 10 $cm^3$ gekochten destillierten Wassers unter Zugabe von 1 Tropfen $^1/_{10}$ Normalnatronlauge eine Vergleichsflüssigkeit her. Man titriert die Probe der Nährflüssigkeit bis zur Gelbfärbung, die in der Vergleichslösung herrscht. Dieser Titer wird wieder notiert. Hierauf füllt man die Kultur auf ihr ursprüngliches Volumen (50 $cm^3$) in der oben angegebenen Weise auf und nimmt mit 10 $cm^3$ derselben die Titration unter Zusatz von 3 Tropfen Dimethylamydoazobenzol vor, bis zur Erreichung eines deutlichen Farbenumschlages nach dem Gelb, wie es die angegebene Vergleichsprobe zeigt. Berechnet wird wieder die Gesamtmenge in 100 $cm^3$ nach der oben angegebenen Vorschrift, wobei aber der Säuregehalt des ursprünglichen Nährsubstrates addiert bzw. der Alkaligehalt abgezogen wird.

Bezüglich der Zuckerbestimmungen in Kulturflüssigkeiten verweise ich auf die 1. Hälfte des II. Bandes dieses Handbuches, wo die betreffenden Methoden ausführlich behandelt sind. Für bakteriologische Zwecke seien besonders empfohlen die gewichtsanalytische Kupfermethode nach *Allihn* und *Pflüger* und die Phenylhydrazinmethoden, wozu nur bemerkt sei, daß immer Kontrollbestimmungen mit den unverimpften sterilisierten Nährsubstraten anzustellen sind. Dies ist besonders bei der Verwendung von Saccharose als spaltbare Kohlenstoffquelle in dem Kultursubstrat zu beachten.

## VII. Das Tierexperiment.

### Die wichtigsten Tiere und ihre Zucht.

Die medizinische Bakteriologie kann den Tierversuch nicht entbehren, obgleich die dabei gewonnenen Ergebnisse keineswegs ohne weiteres auf die Verhältnisse beim Menschen übertragen werden dürfen. Auch die veterinär-bakteriologischen Untersuchungen erheischen unbedingt die Ausführung von Tierversuchen.

Bei denselben werden nun die verschiedensten Tiere verwendet. Gewöhnlich werden gebraucht die weiße und graue Maus, das Meerschweinchen und das Kaninchen. Seltener finden in der Bakteriologie zu Tierversuchen Verwendung der Hund, von Vögeln das Huhn und die Taube. Zu besonderen Untersuchungen werden mitunter auch Amphi-

bien und Reptilien herangezogen. Die großen Säuger, wie das Pferd, das Rind, die Ziege und das Schaf, dienen in erster Linie zur Gewinnung der Immunsera, deren Herstellung und Entnahme hier füglich übergangen werden kann.

Für die bakteriologischen Tierexperimente verwendet man im allgemeinen nur gesunde, erwachsene und nicht übermäßig alte Tiere, sofern nicht bestimmte Untersuchungszwecke eine Ausnahme erfordern. Tiere für einwandfreie, wissenschaftliche Untersuchungen sollen niemals unmittelbar vor dem Gebrauch von der Straße weg gekauft, sondern durch längere Zeit im Laboratorium gehalten und an die Lebensbedingungen in demselben gewöhnt werden. Nur so kann man sich die Überzeugung verschaffen, daß die Tiere tatsächlich gesund zum Experiment kommen.

Für Laboratorien, die sehr viel mit Tierversuchen zu tun haben, empfiehlt sich die Züchtung der am meisten gebrauchten Versuchstiere, wie der weißen Maus, der Meerschweinchen und der Kaninchen. Die genannten Tiere sind leicht züchtbar, ohne große Auslagen für Käfige und Ställe, abgesehen von den Erhaltungskosten, die bei einer etwas größeren Meerschweinchen- oder Kaninchenzucht immerhin ziemlich beträchtlich sind.

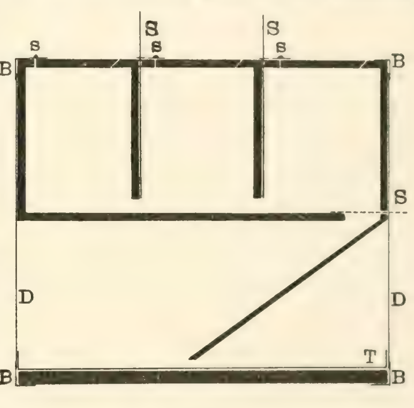


Fig. 387.

Für die Mäusezucht erweist sich folgender Käfig sehr zweckmäßig, von dem die Fig. 387 einen Längsschnitt wiedergibt. Derselbe besteht aus einem stärkeren Bodenbrett in den Dimensionen 25 : 50 : 1·5 *cm*. Dasselbe ist an einer Längsseite und den beiden Kurzseiten mit starkem, rechtwinkelig gebogenem Zinkblech eingefaßt, an das sich ein engmaschiges Drahtgitter *(D)* ringsum in der Höhe von 30—35 *cm* anschließt. Die nicht mit dem Zinkblech versehene Längswand ist ebenfalls durch ein Drahtgitter in die Höhe verlängert, das aber nicht bis zum Brett reicht und hier einen Spalt frei läßt, durch den eine niedere (ca. 1 *cm* hohe) Zinkblechtasse *(T)* eingeschoben wird. Der untere Teil der Drahtverkleidungen von den kürzeren Seiten besitzt Türen, die entweder aus Blech gefertigt sind und in Fälzen gleiten, oder einfach mit Bändern angeschlagen sind. In der Höhe von ungefähr 15 *cm* enthält der Käfig ein Stockwerk, das aus 3 Abteilungen besteht, die durch kleine Öffnungen

miteinander in Verbindung stehen. An der vorderen und hinteren Längsseite führen schräge Brettchen von unten in das Stockwerk, ebenfalls durch kleine Öffnungen. Sämtliche Abteilungen sind durch Schiebetüren *(S)* von außen verschließbar. Der ganze obere Einbau wird am besten aus Holz gefertigt und an dem äußeren Drahtgitter wieder durch rechtwinkelig gebogene Zinkblechstreifen verankert. So ist er eigentlich nur sicher eingehängt und kann gegebenenfalls herausgenommen, gereinigt oder ergänzt werden, da ihn die Mäuse stark annagen. Jedes Abteil ist überdies noch durch einen in Scharnieren *(s)* beweglichen Deckel verschlossen und so bequem von außen zugänglich. In den Käfig bringt man Heu oder besser feine Holzwolle und bestreut den Boden der Abteilungen und die Blechtasse dick mit Sägespänen oder Torfmull.

Den weißen Mäusen dient als Futter vornehmlich Brot und Weizenkörner. Außerdem stellt man einige Näpfchen mit Wasser in den Käfig. Für die säugenden Mäuse und später für die Jungen reicht man Milch. Diese Mäusezuchten dürfen keineswegs oftmals gereinigt werden. Erst wenn die Einwohner das eine oder andere Abteil von selbst zu meiden beginnen, ist es Zeit, dasselbe nach Verschluß der Verbindungsöffnungen gründlich vom Schmutz zu befreien.

Auch graue Mäuse lassen sich unter denselben Bedingungen züchten, nur vertragen sie noch weniger Störungen und lieben noch mehr einen finsteren Aufenthaltsort. Sie stellen die gleichen Futteransprüche.

Weiße und graue Ratten werden ebenfalls viel für bakteriologische Tierversuche verwendet. Sie können in ähnlichen Käfigen gehalten werden, doch müssen dieselben bedeutend größer sein und zahlreichere Abteilungen enthalten. Außerdem bietet man ihnen zweckmäßig noch Klettergelegenheiten durch Anbringung von senkrechten Stäben mit kleinen Ästen. Ratten verlangen neben dem Brot noch Fleischkost.

Meerschweinchen und Kaninchen hält man in Verschlägen. Für die ersteren genügen ca. 30 *cm* hohe, oben offene Abteilungen, die untereinander durch verschließbare Öffnungen verbunden sind. Vor allem ist darauf zu achten, daß die Tiere genügend Raum für ausgiebige Bewegungen besitzen. Es genügen schon einige offene, aneinander gestellte und untereinander verbundene Kisten, deren Boden leicht geneigt ist, damit der Urin der Tiere und vergossenes Trinkwasser abfließen kann und die Tiere selbst immer im Trockenen sind. Die Kisten stellt man auf Unterlagen, damit der Boden leicht trocknet. Besser ist es natürlich, einen betonierten Verschlag mit hölzernen Abteilungswänden anfertigen zu lassen. Der Betonboden wird dann mit unterlegten, vielfach durchbohrten Brettern belegt. Als Sommerfutter für Meerschweinchen eignet sich am besten Gras und Gemüseabfälle. Das Winterfutter besteht aus Burgunderrüben und Heu. Trinkwasser muß in jedem Verschlag sein. Im Herbst, besonders aber im Frühjahr ist ein langsamer Übergang von der Grünfütterung zur Trockenfütterung bzw. umgekehrt zu machen. Jungen Bruten gibt man überdies Milch. In Meerschweinchenzuchten stellen sich, nament-

lich im Frühjahr, mitunter Seuchen ein, die innerhalb kurzer Zeit viele Tiere vernichten. In diesem Falle ist der ganze Verschlag zu räumen, die vollständig gesund aussehenden Tiere augenblicklich von den Erkrankten abzusondern und in geringer Zahl in einzelnen Kisten zu halten. Die Verschläge sind gründlich mechanisch zu reinigen, dann mit Formalin sorgfältig zu desinfizieren und erst nach vollständigem Austrocknen neu zu besiedeln.

Kaninchen verlangen kleinere gedeckte Verschläge mit einigen Abteilungen und einen größeren offenen Auslaufplatz. Auch hier sind am besten Holzverschläge, die von oben zugänglich sind. Der Boden des ganzen Kaninchenstalles muß aus einem harten Material hergestellt sein, am besten aus Zement, da diese Tiere sonst sehr tiefe Baue graben. Sie verlangen dieselbe Nahrung wie Meerschweinchen.

Auch die Kaninchen- und Meerschweinchenverschläge werden mit Torf oder Sägespänen eingestreut. Heu oder Gras kommt in kleine, eingehängte Krippen aus verzinktem Eisendraht. Es wird dadurch viel an Futter erspart.

Die Haltung und Wartung der eingangs genannten größeren Säuger kann hier übergangen werden, da sie gewöhnlich in Laboratorien nicht gehalten werden und überdies zu ihrer Pflege ein besonders geschultes Personal verlangen.

Für den Transport der Versuchstiere vom Stall ins Laboratorium verwendet man am besten für die größeren Tiere Kisten aus Zinkblech, deren Deckel Luftlöcher besitzt, und Gläser mit Drahtgitterverschluß für kleinere. Diese Transportgeräte sollen nur für die gesunden, noch nicht infizierten Tiere in Anwendung kommen und niemals zur Aufnahme der bereits geimpften Objekte verwendet werden.

## Tierhalter.

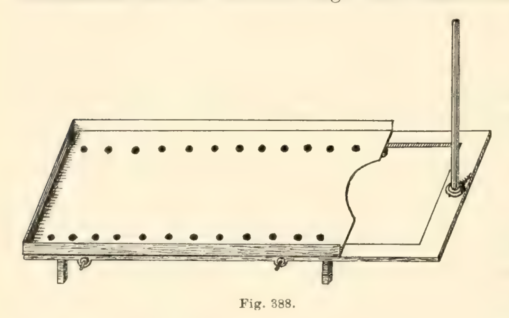
Um an den Tieren möglichst rasch und sicher die nötigen Eingriffe machen zu können, sind dieselben in besonders konstruierten Hältern unbeweglich festzubinden. Solche Operationshalter sind in großer Menge im Laufe der Zeit ersonnen und für die verschiedensten Zwecke ausgeführt worden. Hier sollen nur die einfachsten Erwähnung finden, da sich gerade diese immer noch am zweckmäßigsten erwiesen.

Für die bakteriologischen Tierversuche sollen bei kleineren Tieren nur vollständig aus Metall hergestellte Operationshalter verwendet werden, um sie leicht durch Dämpfern keimfrei machen zu können. *Heim*[1]) gibt einen sehr zweckmäßigen, derartigen Halter für Ratten und Meerschweinchen an. Er besteht aus einer Metallplatte mit zwei langen Längsschlitzen und einem mittleren kurzen. In ersteren gleiten die Schrauben zur Festlegung der Schnüre für die Beine der

[1]) *L. Heim*, Lehrbuch der Bakteriologie. S. 160. Enke, Stuttgart (1906).

Versuchstiere. Letzterer trägt eine Gabel verschiebbar. Neben dieser erheben sich zwei senkrechte Metallstäbe, die einen hoch und tief verstellbaren Querstab besitzen. Am Ende des Kopfteiles vom Halter ist eine Klemme angebracht, in die hinein eine Kornzange gelegt werden kann, welche durch Niederschrauben der Klemme festgehalten wird. Der Gebrauch dieses Halters ist einfach. Eine Nackenfalte der Ratte wird mit der Kornzange gefaßt, dann das Tier mit seinem Hals in die Gabel gelegt und der Querstab so weit herabgedrückt, daß eine Bewegung ausgeschlossen ist. Durch die eingeklemmte Kornzange und den beschriebenen Halshalter ist das Tier schon wehrlos gemacht und seine Beine können leicht in den Schlingen gefaßt und festgestellt werden.

Für Kaninchen und auch erwachsene Meerschweinchen eignet sich der etwas modifizierte Halter nach *Tattin.* Unsere Abbildung Fig. 388 zeigt uns die einfache Einrichtung aus Metall ohne Kopfhalter. Ein eiserner vernickelter starker Rahmen trägt vorne einen senkrechten Metallstab und jederseits zwei Ansätze mit Schrauben, durch die die Beinschlingen des Versuchstieres festgehalten werden. Auf diesem Rahmen ist eine Zinkblechplatte aufgenietet. Dieselbe ist an 3 Seiten aufgebogen und trägt an der vierten einen Bogenausschnitt zur gelegentlichen Aufnahme des Kopfes bei sehr niederer Rückenlage des Tieres. Dieser Halter ruht auf vier Metallfüßen. Am Stab können nun die verschiedensten Kopfhalter montiert werden. Der einfachste ist der nach *Tattin.* Für viele Fälle ist eine Neigbarkeit derselben erwünscht, die zum Beispiel bei dem Halter der Fig. 389 erreicht ist. Hier ist der *Tattin*sche Kopfhalter an eine starke Platte montiert, die auf einer zweiten Platte gleitet und in jeder Lage durch eine Schraube festgehalten wird. Die Kopfhalter müssen in verschiedenen Größen angeschafft werden, um für jede Tiergröße den passendsten zur Hand zu haben.


Fig. 388.

Für Meerschweinchen wurde ein sehr einfacher Halter von *Voges*[1]) angegeben, der in Fig. 390 im Gebrauch wiedergegeben ist. Derselbe besteht aus einer einseitig offenen zylindrischen Metallbüchse, die einen Längsspalt besitzt und deren zweite Öffnung durch ein Drahtnetz verschlossen ist. Das Meerschweinchen wird mit dem Kopf gegen das Drahtnetz gerichtet, eingeschoben und so festgehalten geimpft.

[1]) *F. Selberg,* Beschreibung einiger neuer bakteriologischer Gebrauchsgegenstände. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. 18. S. 529 (1895).

Die Mäuse immobilisiert man gewöhnlich in Haltern nach *Kitasato*, bei denen der Kopf in einer Drahtspange gehalten und der Schwanz mit einer Feder niedergedrückt wird. In Fig. 391 sehen wir ein derartiges Instrument wiedergegeben, das keiner näheren Erklärung bedarf.

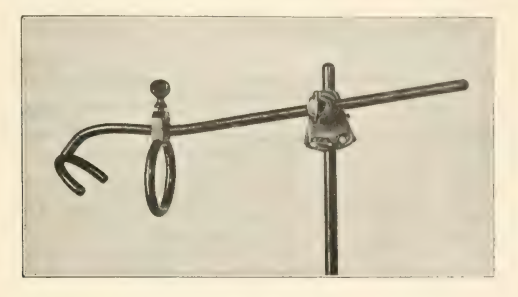
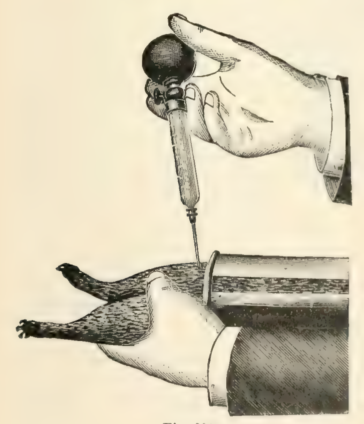


Fig. 389.

Zum Fangen der Ratten und Mäuse aus den Zuchtkäfigen und zum Aufbringen dieser Tiere auf den Halter benutzt man Zangen mit flachen und gekerbten Branschen oder solchen von löffelförmiger Gestalt, die durch einen verschiebbaren Ring zusammengedrückt



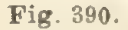


Fig. 390.



Fig. 391.

werden. Unsere Abbildung Fig. 392 zeigt uns oben eine Mauszange und unten zwei Rattenzangen.

Halter für größere Tiere, wie Hunde, sind nur schwierig aus Metall herzustellen. Gewöhnlich benutzt man eine Rinne aus starkem Holz

mit einer Reihe seitlicher Löcher zum Durchziehen der Bänder für die Beinfixierung. Der Kopf wird durch einen neigbaren Halter festgelegt. Es wurden verschiedene Modelle konstruiert, die ihre Vorteile und Nachteile besitzen. Erwähnt sei der Halter von *Malassez* und der Universal-

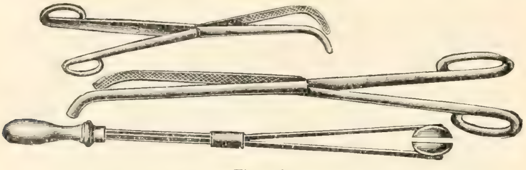


Fig. 392.

halter von *Cowl*[1]), der für kleine Hunde, Kaninchen, Meerschweinchen und auch noch Ratten sehr gut zu gebrauchen ist.

### Wägung und Temperaturmessung.

Um die ersten auftretenden Krankheitserscheinungen nach der Infektion leichter beurteilen zu können und überhaupt einen Einblick in den Verlauf der Infektion zu gewinnen, ist es notwendig, vor jeder Infektion das betreffende Tier einige Tage hindurch in bezug auf sein Gewicht und seine Temperatur zu beobachten. Die Kenntnis des Tiergewichtes unmittelbar vor der Impfung ist auch deshalb erwünscht, um wenigstens eine annähernde Bestimmung der Menge des eingespritzten Bakterienmateriales in bezug auf das Körpergewicht des Tieres machen zu können.

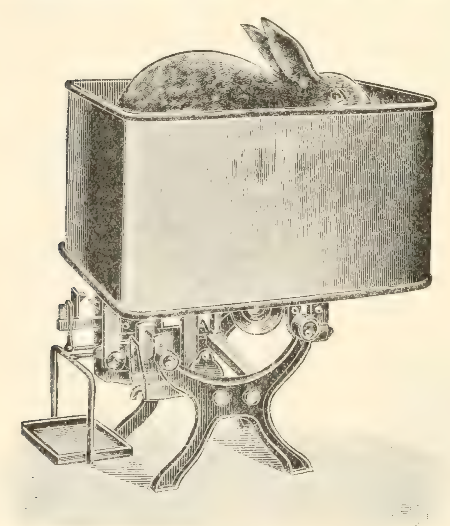


Fig. 393.

Die Wägung der größeren Versuchstiere wird mit der *Duenschmann*schen Tierwage vorgenommen. Dieselbe ist in Fig. 393 abgebildet. Sie ist eine Dezimalwage, die einen viereckigen Behälter besitzt, der durch ein in der Zeichnung nicht angegebenes Gegengewicht austariert ist.

[1]) *Cowl, Du Bois-Reymonds* Archiv (1896).

Kleinere Tiere, wie Mäuse, Ratten etc. werden am besten in einem austarierten Glasgefäß gewogen. Vielfach empfiehlt man zu diesem Zwecke auch Briefwagen, die am Teller einen Halter besitzen. Bequemer und genauer ist aber die zuerst angegebene Wägung.

Die Temperaturmessung geschieht mit in Zehntelgrade geteilten feinen Thermometern. Diese werden in das Rektum des Tieres eingeführt. Aus diesem Grunde muß man mehrere Thermometer in Vorrat haben, die verschieden dicke Quecksilbergefäße besitzen. Für Mäuse sind nur sehr dünne Stabthermometer verwendbar. Diese müssen sehr vorsichtig bei gut immobilisiertem Tier eingeführt werden, weil sonst sehr leicht Verletzungen gesetzt werden. Mäuse sind bei Temperaturmessungen unbedingt auf dem Halter zu befestigen, ebenso Ratten. Größere Tiere, wie Kaninchen und Meerschweinchen, können von einem im Tierhalten geübten Gehilfen auch ohne Halter ruhig gestellt werden. Meerschweinchen sind sehr bequem in dem von *Voges* (vgl. S. 1272) angegebenen Halter zu messen. Die Ablesung soll am eingelegten Thermometer vorgenommen werden, da höchstens bei großen Tieren Maximalthermometer Anwendung finden können. Der Skalenbereich bei Tierthermometern liegt zwischen 28 und 45° C.

## Infektionskäfige.

Die infizierten Tiere müssen streng gesondert von den gesunden Tieren in besonderen Käfigen gehalten werden, die wieder in einem besonderen Raum aufgestellt werden. Am zweckmäßigsten ist es, in einen Behälter nur ein einziges Tier zu geben. Nur wenn mehrere Tiere gleichzeitig mit dem gleichen Infektionsmaterial geimpft wurden, können dieselben in einem größeren Käfig untergebracht werden. In diesem Falle muß aber im Protokoll, das über jeden Tierversuch zu führen ist, eine genaue Beschreibung des Tieres aufgenommen werden, die es ermöglicht, jedes Tier sicher wieder zu erkennen. Meerschweinchen lassen sich nach der Farbenverteilung ihres Haarkleides leicht beschreiben, meistens auch Kaninchen. Von der Zeichnung der Tiere mit Anilinfarben kann nur abgeraten werden, da sich bei längerer Versuchsdauer die Farben verwischen und undeutlich werden. Für Mäuse und Ratten ist die Einzelunterbringung in Gläsern oder kleinen Käfigen am zweckmäßigsten.

Dort, wo es sich nicht um die gleichzeitige Aufsammlung von Stoffwechselprodukten handelt, sind am besten Käfige, die vollständig aus Metall gefertigt sind. Sie sind leicht zu reinigen und zu sterilisieren. Fig. 394 zeigt uns einen solchen Infektionskäfig, bestehend aus einem Blechuntersatz, an dem ein Drahtoberteil abnehmbar befestigt ist. Zwar etwas teurer, aber dafür besser für das Tier, sind Käfige, deren Unterteil noch ein Drahtgitter besitzt, auf dem die Tiere sitzen. Diese Art von Käfigen haben auch eine Lade zur Aufnahme der Ausscheidungen. Dadurch werden die Tiere ständig trocken gehalten. Die Blechtasse bestreut man in dicker Schicht mit Torfmull oder Sägespänen. Die für größere Tiere

bestimmten Einzelkäfige sind gewöhnlich in der zuletzt angegebenen Art ausgeführt. In Fig. 395 sehen wir einen derartigen Kaninchenkäfig.

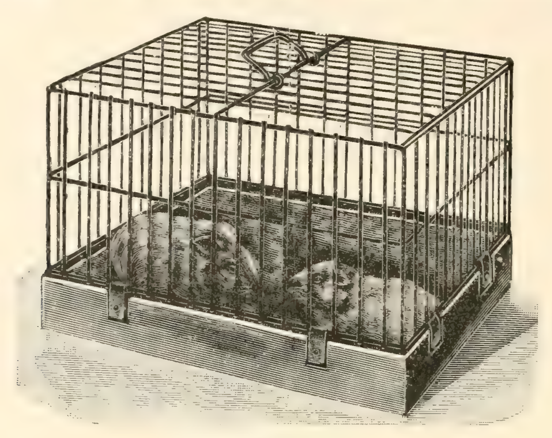


Fig. 394.

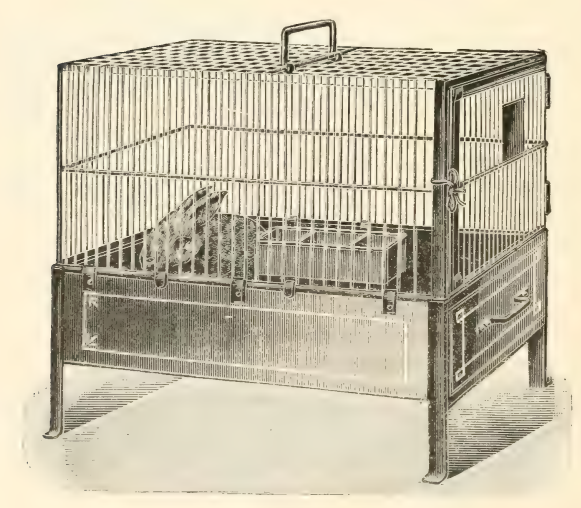


Fig. 395.

In jeden Käfig kommt ein Gefäß mit Wasser, das einige Male des Tages zu erneuern ist. Das Futter wird den Tieren in Trögen gereicht,

die sich entweder an der Käfigwand befinden, wie es aus Fig. 395 ersichtlich ist, oder noch besser in Ausschnitte der Seitenwand einfügen lassen, die nach dem Herausnehmen der Tröge durch Schieber geschlossen werden. Damit entfällt jedes Hineingreifen in den Käfig.

Vögel werden am besten in den gleichen Käfigen gehalten, in denen man noch einige Querstäbe aus dickem Holz zum Aufsitzen anbringt. Bei Hühnern kann davon abgesehen werden.

Die mit geimpften Tieren beschickten Käfige werden, wie schon angedeutet, in einem besonderen Raum auf Regalen untergebracht. Zwischen den einzelnen Käfigen genügt ein Raum von ca. $^1/_2$ *m*, um sicher jede Krankheitsübertragung von einem Käfig in den anderen hintanzuhalten.

Mäuse und Ratten werden am besten in breiten und hohen Gläsern gehalten, die mit einem durch Bleiplatten beschwerten Gitterdeckel aus Metall verschlossen sind. In das Glas gibt man eine etwa 2—3 *cm* hohe Lage von Torfmull oder Sägespänen. Fig. 396 veranschaulicht ein solches Mäuseglas mit Gitterdeckel.

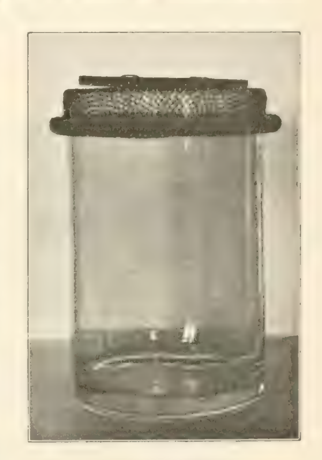


Fig. 396.

Infizierte Frösche, Salamander oder Schlangen werden entweder in größeren Glaswannen oder in Blechgefäßen mit Gitterdeckel gehalten. Sie müssen reichlich Wasser zur Verfügung haben.

Unter den genannten Bedingungen können natürlich nur solche Versuchstiere gehalten werden, bei denen keine weitere Übertragung des Infektionsmateriales durch den Käfigstaub auf den Menschen zu befürchten ist. Ist eine solche Gefahr vorhanden, wie beispielsweise bei Pesttieren, dann dürfen nur staubsichere Käfige zur Aufnahme des geimpften Tieres Verwendung finden. Solche Käfige wurden in verschiedenen Ausführungen angefertigt, die alle ihren Zweck erfüllen. Bei ihnen sind sämtliche durch Gitter verschlossene Öffnungen mit Wattefiltern versehen. Der Deckel des Käfigs ist staubdicht aufgepaßt. Außerdem haben diese Tierbehälter ein Fenster, um das Tier ständig beobachten zu können. Dasselbe ist in Metall gefaßt, durch ein Schutzgitter gesichert und mit Kautschukdichtungen staubsicher angesetzt. Es bedarf wohl nicht einer besonderen Erwähnung, daß solche Käfige vollständig aus Metall herzustellen sind. Für sie ist die runde Form am zweckmäßigsten. Infolge der angegebenen Bauart können sie entweder komplett in ein Desinfektionsmittel eingelegt werden oder nach Lösung der Fensterdichtung und Entfernung des Fensters im Dampf sterilisiert werden.

Sämtliche Abfälle und Unratstoffe aus Infektionskäfigen sind entweder sofort zu verbrennen oder in ein kräftiges Desinfektionsmittel einzubringen. Auch die Käfige sind nach dem Gebrauch sofort einer gründlichen Desinfektion oder Sterilisation zu unterwerfen.

## Infektionsspritzen.

Für Infektionszwecke sind ausschließlich Spritzen zu verwenden, die nur aus Glas und Metall gemacht sind, ohne Verwendung von Schrauben und Kittmassen. Die Spritzen müssen gegebenenfalls auch eine Sterilisation durch Hitze ohne weiteres vertragen. Zur Injektion abgemessener Mengen von Bakterienaufschwemmungen sind verschiedene Spritzenmodelle ersonnen worden, die in zwei große Gruppen zerfallen: in solche, die einen Stempel besitzen und in solche, die stempellos sind. Die letzteren

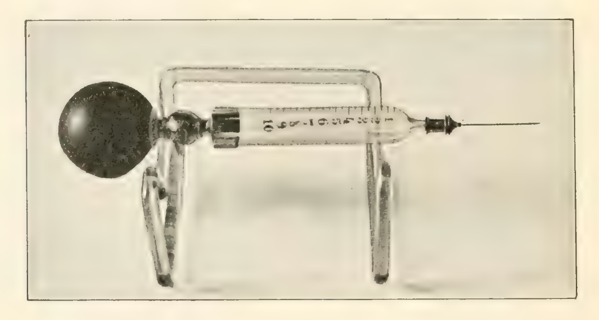


Fig. 397.

sind jedenfalls überall dort vorzuziehen, wo kein festes Gewebe der eingespritzten Flüssigkeit größere Hindernisse entgegenstellt.

Sehr handlich ist für die gewöhnlichen Infektionszwecke, wo es auf keine genauere Dosierung der verwendeten Menge ankommt, die bekannte *Koch*sche Spritze, welche aus einer in ganze oder halbe Kubikzentimeter geteilten Röhre besteht, die oben einen Schliff zum Ansatze des Gummiballons mit Metallhahn trägt und unten einen verengten Teil zum Anstecken der Kanüle. In Fig. 397 ist eine derartge Spritze auf einem gläsernen Gestell liegend abgebildet. Man verwende ausschließlich Kanülen aus Platin-Iridium, welche den Vorteil der Unverwüstlichkeit und der Möglichkeit des unbeschadeten Ausglühens besitzen. Der abnehmbare Glaskörper der Spritze läßt sich nach jeder Art sterilisieren. Der Gummiballon, welcher auf den Hahnteil aufgesteckt wird, hat oben ein kleines Loch. Beim Gebrauch wird die Kulturaufschwemmung bei verschlossenem Loch aufgesaugt und dann bei zugehaltener Ballonöffnung eingespritzt.

Für genauere Dosierungsversuche hat *Klemensiewicz* eine vollständig gläserne Spritze[1]) konstruiert, die ebenfalls sehr angenehm im Gebrauch ist und deren Körper noch zu der später angegebenen Dosierungsmethode ohne weiteres sehr gut verwendbar ist. Wie aus beistehender Durchschnittszeichnung ersichtlich ist (Fig. 398), besteht dieselbe aus einem genau kalibrierten, schmalen, langen Glasrohr, das entweder 1 oder 2 *cm*³ faßt. Dasselbe trägt eine Teilung, deren einzelner Zwischenraum 0·01 *cm*³ entspricht. An der unteren geschliffenen Verengung wird die Kanüle angesetzt. Der obere Teil ist konisch geschliffen. Hier wird der Glashahn

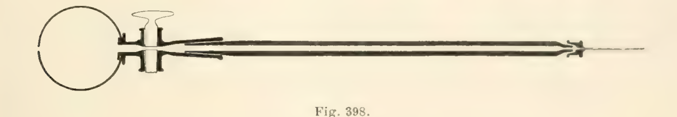


Fig. 398.

aufgesetzt, der oben einen Kautschukballon trägt, der ein kleines Loch hat. Im übrigen ist der Gebrauch gleich wie bei der *Koch*schen Spritze.

Auch die *Strohschein*sche Injektionsspritze ist für bakteriologische Versuche sehr brauchbar und einfach im Gebrauch. Fig. 399 zeigt uns dieselbe. Sie besitzt ein gläsernes Spritzengefäß mit 1—5 *cm*³ Inhalt, das entsprechende Marken trägt. Oben hat dasselbe eine kleine Öffnung, unten den Ansatz zum Aufschieben der Kanüle. Darüber geschoben wird ein nicht vollständig anschließender Glaszylinder, der durch einen

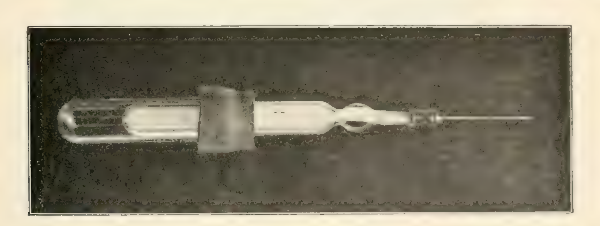


Fig. 399.

Kautschukschlauch mit dem Spritzenkörper luftdicht verbunden wird. Beim Gebrauch gibt man dem Druckzylinder eine mittlere Stellung, wie es die Figur zeigt. Dann saugt man durch Hinaufziehen des Zylinders die Spritze voll, steckt die Kanüle an und preßt die Injektionsflüssigkeit durch langsamen Druck ein. Für genauere Dosierungen ist dieselbe ungeeignet.

---

[1]) Diese Spritze ist bisher nicht publiziert. Herr Prof. Dr. *Klemensiewicz* gestattete mir, dieselbe hier zu beschreiben, wofür ich ihm bestens danke. Diese Spritze ist beim Mechaniker und Glasbläser Gustav Eger, Graz, Zinzendorfgasse, in tadelloser Ausführung erhältlich.

Durch die erst jüngst veröffentlichte Spritze mit einem verbesserten Druckansatze von *Küster*[1]) soll es gelingen, äußerst genaue Dosierungen vorzunehmen. Da ich sie nicht probierte, kann ich darüber kein Urteil fällen. Den Ausführungen des Autors entsprechend scheint sie sehr gut zu funktionieren. Da hier auch durch komprimierte Luft die Austreibung der Injektionsflüssigkeit erfolgt, gehört sie eigentlich zu den stempellosen Spritzen. Im übrigen sei auf die angezogene Originalarbeit verwiesen.

Die Zahl der Stempelspritzen, die sich für unsere Zwecke eignen, ist eigentlich sehr gering. Darunter sind jene verstanden, bei denen ein Stempel aus Glas oder Metall unmittelbar auf die Injektionsflüssigkeit drückt. Sie sind dort am Platze, wo ein derbes Gewebe dem eintretenden Flüssigkeitsstrom ein bedeutendes Hindernis entgegensetzt. Hie und da kommt es vor, daß in diesem Falle die stempelfreien Spritzen versagen, da der durch den Kautschukballon erreichbare Luftdruck zu gering ist.

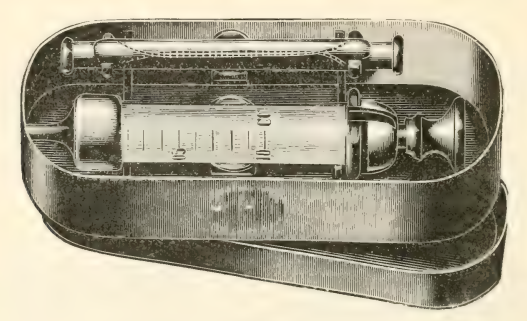


Fig. 400.

Für weniger genaue Abmessungen ist für diese Zwecke am empfehlenswertesten die „Rekordspritze", bei der im gläsernen Spritzenkörper, an dem Metallfassungen angeschmolzen sind, ein tadellos eingeschliffener Metallstempel auf die Flüssigkeit drückt. In Fig. 400 ist dieselbe wiedergegeben. Aus der Zeichnung sind die Einzelheiten ohne weiteres zu entnehmen.[2])

Es wurden auch Spritzen mit eingeschliffenem Glasstempel gebaut, die zwar ebenfalls recht brauchbar sind, aber auch sehr gebrechlich.

Alle übrigen Konstruktionen mit Schrauben und Dichtungen aus Leder od. dgl., dann Spritzen mit Asbeststempeln sind für bakteriologische Zwecke nicht brauchbar.

[1]) *E. Küster*, Vorrichtung zur genauen Abmessung, Mischung und Injektion kleinster Flüssigkeitsmengen. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Originale. Bd. **50**. S. 490 (1909). — Vgl. auch: Derselbe, Eine neue Saugvorrichtung für Pipetten zur genauen Abmessung kleinster Flüssigkeitsmengen. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. **40**. S. 270 (1906).

[2]) *L. Heim*, Lehrbuch der Bakteriologie. S. 158. Enke, Stuttgart 1906.

## Narkose.

Bei den in der Bakteriologie vorkommenden Tierversuchen wird man nur in den seltensten Fällen eine Narkose vornehmen, zumal die hier in Frage kommenden Eingriffe verhältnismäßig geringfügiger Natur sind. Die Narkose ist nur bei größeren präparativen Arbeiten am und im Tierkörper indiziert und besonders bei wilden Tieren, die sich sonst kaum ohne Schädigung fassen lassen. Dies gilt besonders für Ratten und graue Mäuse. Zur Narkose verwendet man reines Chloroform. Eine besondere Maske braucht man auch für größere Tiere nicht. Es genügt, das Chloroform auf Watte zu bringen, diese in eine dem Kopfe des Tieres angepaßte einseitig offene Blechbüchse zu geben, darauf noch eine Lage reine Watte zu legen und diese beschickte Büchse dem Tiere über den Kopf zu stülpen. Kleine, in Gläsern gehaltene Tiere (Mäuse, Ratten) chloroformiert man am einfachsten durch Einträufeln von Chloroform auf die im Glase befindlichen Sägespäne oder Einwerfen eines mit dem Narkotikum getränkten Wattebausches. Eine Menge von $^1/_4$—$^1/_2$ *cm*³ Chloroform genügt für ein Mäuschen vollständig. Die Narkose tritt außerordentlich schnell ein. Bei jeder Narkose ist besonders darauf zu achten, daß nicht Schleimhäute des Tieres mit Chloroform bespritzt werden.

Kaninchen und Hunde, besonders letztere, vertragen überaus große Morphiumdosen. Um eine möglichst ruhige Narkose einzuleiten und durchzuführen, ist es vorteilhaft, zirka eine Viertelstunde vor der Chloroformierung eine Morphiuminjektion subkutan zu geben. Einem erwachsenen Kaninchen können ohne Schaden 30—70 *mg* Morphium, entsprechend dem Körpergewicht, unter die Haut gespritzt werden.

Es sei aber nochmals besonders hervorgehoben, möglichst den Gebrauch der Narkose einzuschränken und nur dann zu betäuben, wenn sonst der Versuch überhaupt unmöglich ist. Beispiele aus der bakteriologischen Literatur lehren, daß mitunter die Empfänglichkeit für Injektionen durch die Narkose gesteigert wird, ein Umstand, der sehr zu beachten ist.

## Infektionsmethoden.

Die Impfung durch die Atmungs- und Verdauungsorgane kann entweder bei dem intakten Tier oder auf operativen Wegen vorgenommen werden. Die Infektion durch Einatmung bewirkt man dadurch, daß man das Tier in einen gut schließenden Blechkasten gibt, in dem man eine Aufschwemmung des Infektionsmateriales in Wasser versprayt oder Impfmaterial trocken verstäubt. *Buchner*[1]) hat einen zweckmäßigen Bakterienspray konstruiert, den beistehende Fig. 401 im Schnitt wiedergibt. Er wird mit einem Doppelgebläse aus Kautschuk

[1]) *H. Buchner*, Einfacher Zerstäubungsapparat zu Inhalationsversuchen. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. 6. S. 274 (1889).

betrieben. Ein dickwandiges Proberohr enthält einen Zerstäuber. Die zerstäubten Massen werden durch ein weiteres Rohr in den geschlossenen Kasten zum Tier geleitet. Auf diese Weise kommen nur die allerfeinsten Tröpfchen in den Infektionsraum, während die größeren Tröpfchen im Proberohr bleiben und wieder zerstäubt werden. Der Verbrauch an Aufschwemmung ist auch ein dementsprechend minimaler. Man beschickt den genannten Zerstäuber mit höchstens 10 *cm*³ flüssiger Kultur oder Kulturaufschwemmung. Der geschlossene Kasten für Meerschweinchen soll 30—50 Liter Rauminhalt haben. Um eine gleichmäßige Verteilung der bakterienhaltigen Wassertröpfchen und eine Erneuerung der Luft im Kasten zu erreichen, kann eine größere Öffnung angebracht werden, die ein Wattefilter enthält. Man verwendet dazu die gewöhnliche, nicht entfettete Watte. Erst einige Zeit nach dem Stillstand des Zerstäubers öffne man den Infektionsraum und entnehme das Tier, damit die Wassertröpfchen sich vorher samt und sonders an den Wänden und am Boden anlegen. Sonst kann man Gefahr laufen, sich selbst zu infizieren.

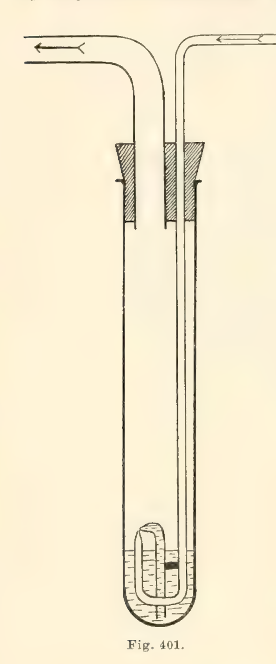


Fig. 401.

Für Einatmungsversuche mit Pestbakterien hat *Martini*[1]) einen besonderen Apparat angegeben, der einen sicheren Schutz dem Experimentator gewährt.

Bei den Inhalationsversuchen mit bakterienhaltigem Staub werden entweder unmittelbar die getrockneten Bakterienkulturen oder bakterienhaltigen Substrate (Sputa, Eiter etc.) verrieben oder besonders feinkörniges Pulver (Bärlappsamen, Sporen von Bovisten, Kohlenpulver etc.) mit Bakterienkulturen getränkt und nach dem Trocknen verstäubt. Man benutzt ebenfalls geschlossene kleine Behälter, in die die Tiere gebracht werden und wo dann der bakterienhaltige Staub durch eingeblasene Luft verstäubt wird. Staubdicht werden diese Behälter durch Wattedichtungen und Wattefilter gemacht.

Bei den bisher genannten Infektionsmethoden wird das Haarkleid des ganzen Tieres infiziert. Deshalb müssen derartig geimpfte Tiere in vollständig geschlossenen Käfigen, wie solche als Pestkäfige auf S. 1277 beschrieben sind, gebracht werden. Die Übertragung vom Infektionsraum in den Käfig soll möglichst mit Zangen vorgenommen werden, um einer

[1]) *E. Martini*, Über Inhalationspest der Ratten. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektkr. Bd. 38. S. 332 (1901).

Selbstinfektion des Experimentators sicher vorzubeugen. Auch bei der späteren Sektion ist auf den Umstand besonders Rücksicht zu nehmen, daß das ganze Tier auch äußerlich mit Bakterien beladen ist.

Mit gutem Recht hat man gegen die bisher genannten Inhalationsversuche den Einwand erhoben, daß dabei sicher auch eine Unzahl von Bakterien verschluckt wird und auf den Schleimhäuten der Mundhöhle oder Nase und des Rachens kleben bleibt. Dementsprechend kann damit kein einwandfreier Inhalationsversuch gemacht werden.

Um nun das Material sicher nur in die Lunge bzw. auf die Lungenschleimhaut zu verimpfen, legt man die Trachea frei und spritzt in diese unmittelbar den Infektionsstoff ein. Dabei ist natürlich eine Infektion der Operationswunde sorgfältig hintanzuhalten. Bezüglich der Details bei der Ausführung dieser Methode sei auf die Angaben von *A. Gramatschikoff* verwiesen, die sich im 1. Band der Arbeiten aus dem pathologisch-anatomischen Institut zu Tübingen finden.

Weit einwandfreier gelingt die Einbringung von Bakterienaufschwemmungen in den Magen des Versuchstieres. Die Darreichung kann entweder mit Speisebrocken geschehen, die nach *Koch*, *Gaffky* und *Loeffler*[1]) in ihrem Innern die Bakterienkulturen enthalten, oder durch Einbringung von Kulturaufschwemmungen mit Hilfe eines durch den Schlund in den Magen eingeführten Rohres. Für die erstere Impfung bereitet man die Brocken in der Weise, daß man Kartoffelstückchen aushöhlt, dann in die Höhlung das Infektionsmaterial gibt und die Öffnung wieder verschließt. Bringt man Säugern einen solchen Brocken auf den hinteren Zungenabschnitt, so wird derselbe sofort ungekaut verschluckt. Man kann mit flüssigen Kulturen unter Zusatz von Mehl auch einen Teig bereiten und aus diesem die Brocken formen, die, wie früher mitgeteilt, verfüttert werden.

Die Impfung mit Hilfe der Schlundsonde wird folgendermaßen ausgeführt[2]): Das Meerschweinchen, um das es sich hier in erster Linie handelt, wird in Rückenlage auf einen Tierhalter gespannt. Ist ein Gehilfe zur Hand, so kann der Kopf frei bleiben. Arbeitet man allein, muß ein Halter verwendet werden, der den Ober- und Unterkiefer des Tieres auseinandergespreizt festhält. Im ersteren Falle schiebt man dem Tiere ein durchlochtes Brettchen in den Mund und entfernt die Kiefer durch Querstellen desselben. Dieses Brettchen besitzt eine geräumige Öffnung zum Durchführen der mittelharten Schlundsonde. In der angegebenen Lage wird das Brettchen samt dem Kopf entweder von einem Gehilfen festgehalten, oder der Operateur hält mit der einen Hand den Kopf fest und führt mit der anderen die Sonde ein, wie es in Fig. 402 abgebildet ist. Nun wird die ungefähr 3 *mm* starke Schlundsonde (aus Kautschuk)

---

[1]) *Koch, Gaffky* und *Loeffler*, Experimentelle Studien über die künstliche Abschwächung der Milzbrandbazillen und Milzbrandinfektion durch Fütterung. Mitteilungen a. d. kais. Gesundheitsamt Berlin. Bd. 2. S. 147 (1884).

[2]) Vgl.: *R. Koch*, Berliner klin. Wochenschr., Jg. 1885.

mit einer Marke versehen, bis zu welcher sie eingeführt werden soll. Man messe die Sondenspitze etwa fingerbreit unter dem Schwertfortsatz des Brustbeines ansetzend bis zu den Schneidezähnen des aufgespannten und gestreckten Tieres und markiere diese Stelle durch einen um die Sonde geknüpften Bindfaden. Das Ende der Schlundsonde wird mit einem Kautschukschlauch versehen, in den der Spritzenansatz gesteckt wird. Nun fettet man die Spitze der Sonde ein und führt sie durch das Loch des Brettchens hindurch vorsichtig ein. Die sofort auftretenden Schluckbewegungen des Tieres erleichtern die Einführung sehr. Das Infektionsmaterial kommt in eine der früher besprochenen, gläsernen Spritzen und wird langsam, bei größeren Quantitäten unter Einhaltung kürzerer Pausen in den Magen



Fig. 402

des Tieres gepreßt. Zur Ausschaltung der Wirkung des sauren Magensaftes kann man vor der Einbringung der Bakterien eine Aufschwemmung von gebrannter Magnesia in Wasser[1]) durch die Schlundsonde geben. Zur Sistierung der Darmperistaltik injizierte *Koch* in die Bauchhöhle Opiumtinktur in einer Dosis von 1 $cm^3$ auf je 200 *g* Meerschweinchenkörper.

Die kutane Impfung[2]) erfolgt von der äußeren Haut aus durch leichtes oder stärkeres Einreiben des Impfmateriales. Es werden entweder

[1]) *Heim* (Lehrb. d. Bakteriol. S. 169. Stuttgart 1906) empfiehlt Magnesia usta als weniger schleimhautreizendes Neutralisationsmittel. — *Koch* verwendete ursprünglich einige Kubikzentimeter einer $5^0/_0$igen Sodalösung.

[2]) Literatur bei *F. Fritsche,* Versuche über Infektion durch kutane Impfung bei Tieren. Arb. a. d. kais. Gesundheitsamt Berlin. Bd. 18. S. 453 (1902).

unbehaarte Stellen des Tieres aufgesucht oder das Haarkleid durch vorsichtiges Abschneiden, eventuell Rasieren, entfernt. Am besten sind jene Hautstellen, die das Tier weder kratzen noch lecken kann.

Hier sei auch auf die Methode der Infektion durch Aufbringen von Bakterien auf die gesunde, leicht zugängliche Schleimhaut des Auges und der Scheide, eventuell der Nase hingewiesen. Über die Technik dieser Versuche braucht kaum etwas gesagt zu werden.

Bei der subkutanen Infektion wird das Impfmaterial unter die Haut gebracht. Dies kann einerseits durch eine kleine Schnittwunde geschehen, andrerseits durch Einspritzung von Bakterienaufschwemmungen mit Injektionsspritzen. Auch hier wird man Stellen des Tieres bevorzugen, die demselben weder durch Kratzen noch durch Lecken zugänglich sind. An der betreffenden Stelle wird durch Rasieren das Haarkleid sorgfältig entfernt und eine lokale Desinfektion der Haut mit Alkohol (50—60%igem) vorgenommen. Nun macht man mit einem sterilen Messer einen kurzen, die Haut vollständig durchtrennenden Einschnitt oder hebt mit einer sterilen Federzange eine Hautfalte auf, die man mit der Schere einschneidet. Hierauf formiert man mit einem ausgeglühten, wieder ausgekühlten kleinen Platinspatel eine Hauttasche, in die dann mit demselben Gerät Bakterienkultur eingebracht wird. Handelt es sich um einzubringende Gewebsstücke, werden sie mit einer feinen sterilisierten Federzange eingeschoben. Die Hautwunde wird nun zugedrückt und am besten mit sogenanntem elastischen Kollodium sofort verklebt, sofern es sich um einen kleinen Schnitt handelt. Ist die Wunde größer, wird sie einfach vernäht.

An weißen Mäusen wird immer an der Schwanzwurzel subkutan geimpft nach Anbringung eines kleinen Hautschnittes, der hier am besten mit der Schere gemacht wird. Die Schwanzwurzel wird trocken rasiert, dann mit wenig verdünntem Alkohol ohne starke Benetzung des Tierchens desinfiziert. Nunmehr hebt man mit einer sterilen Federzange über der Schwanzwurzel eine Hautfalte der Länge nach auf und zwickt sie mit der Schere quer ein. Ohne mit der Federzange auszulassen, verimpft man mit der Platinnadel oder -Öse und drückt die Wunde zusammen. Hierauf verklebt man mit Kollodium.

Auch die Hornhaut verschiedener Tiere eignet sich vorzüglich zur Infektion, da man in dem durchsichtigen Gewebe den ganzen Verlauf sehr gut studieren kann. Am einfachsten geschieht die Infektion der Cornea dadurch, daß man das Impfmaterial auf eine feine Nadel bringt und eine kleine Stichverletzung setzt.

Für viele Zwecke ist auch die vordere Augenkammer ein sehr geeigneter Infektionsort. Die Ausführung ist aber nicht sehr leicht und muß sehr vorsichtig gemacht werden. Der Augapfel des Tieres wird kokainisiert. Nach Anfassen einer Bindehautfalte mit einer Klemmpinzette wird der Bulbus nach unten gedreht und mit einer Lanzette am oberen Rande der Cornea eingegangen, bis die Lanzenspitze in der Augenkammer sichtbar wird. Nun wird parallel mit der Iris bis zur Pupillenmitte weiter-

gegangen. Beim Herausziehen des Messerchens ist die Spitze desselben gegen die Hornhaut zu richten und langsam zurückzuziehen. Das Infektionsmaterial kann nun durch eine Irisfederzange oder durch eine Spritze mit feiner Kanüle eingebracht werden. Man kann auch ohne Einschnitt durch Einführen einer dünnen Kanüle die Infektion vornehmen. In diesem Falle sticht man die Hohlnadel zuerst allein ein und läßt das Kammerwasser abfließen. Dann steckt man die mit dem Impfmaterial gefüllte Spritze an die Kanüle und injiziert. Um einen Überdruck in der Kammer zu vermeiden, spritzt man höchstens soviel ein, als dem Fassungsraum derselben entspricht. Nach den Angaben von *Manfredi* und *Viola*[1]) dürfen in die vordere Augenkammer des Kaninchens 0·2—0·3 *cm*³, in die des Meerschweinchens 0·1—0·2 *cm*³ eingeimpft werden.

Sehr häufig wird die Infektion in die Bauchhöhle vorgenommen. Bei dieser ist besonders auf die Vermeidung von Verletzungen des Darmes und der Leber zu achten. Letztere vermeidet man dadurch sicher, daß man immer den linken Bauchteil des Tieres wählt. Bei der Verwendung stumpfer Hohlnadeln zur Einspritzung werden auch Darmverletzungen meistens ausbleiben. Da die äußere Haut des Tieres der eindringenden Nadel den größten Widerstand entgegensetzt, ist es zweckmäßig, zuerst eine kleine Hautwunde anzulegen und in dieser mit einer stumpfen Kanüle einzugehen.[2]) Die Ausführung einer Impfung in die Bauchhöhle wird kurz folgendermaßen ausgeführt: Das Tier wird mit dem Bauche nach oben auf einen Halter gespannt, dann auf der linken Bauchseite zuerst geschoren und dann in einem kreisförmigen Feld von ca. 3 *cm* Durchmesser rasiert. Hierauf desinfiziert man die rasierte Bauchhaut mit 60%igem Alkohol, hebt dann mit einer sterilen Pinzette eine kleine Falte der Haut auf und schneidet sie mit einer sterilen Schere ein. In der klaffenden Wunde wird nun die stumpfe Kanüle eingestoßen, welche sehr leicht die Muskulatur durchdringt, und die Einspritzung vollzogen. Nach Entfernung der Kanüle verklebt man die kleine Wunde mit Kollodium. Meerschweinchen lassen sich auch ohne Aufspannen leicht intraperitoneal einspritzen, wenn man einen Gehilfen hat, der das Tier zu halten versteht. Die eine Hand umfaßt die beiden hinteren Füße, während die andere das Tier vorne so faßt, daß der Kopf in der Hohlhand ruht. Wenn kein geschulter Gehilfe zur Hand ist, muß vor dem einfachen Halten gewarnt werden, da bei unruhigem Tier sehr leicht Darmverletzungen zustande kommen.

Erwähnt sei hier noch die besonders für die intraperitoneale Infektion konstruierte Kanüle von *Stevenson* und *Bruce*[3]), bei deren Gebrauch

---

[1]) *L. Manfredi* und *P. Viola,* Der Einfluß der Lymphdrüsen bei der Erzeugung der Immunität gegen ansteckende Krankheiten. Zeitschr. f. Hyg. Bd. **30**. S. 64 (1899). Technik der Impfung. S. 66. Dort auch Literatur über Infektion der vorderen Augenkammer.

[2]) Vgl. *R. Pfeiffer,* Die Differentialdiagnose der Vibrionen der Cholera asiatica mit Hilfe der Immunisierung. Zeitschr. f. Hyg. Bd. **19**. S. 73, 91 (1895).

[3]) *W. F. Stevenson* und *D. Bruce,* Eine neue Methode, Flüssigkeiten in die Bauchhöhle der Versuchstiere einzuspritzen. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. **9**. S. 689 (1891).

Darmverletzungen ausgeschlossen sind. Dieselbe ist gekrümmt, wie aus Fig. 403 hervorgeht. Ihr Vorderteil (zwischen *a* und *b*) ist massiv und endigt in eine scharfe Spitze. Die hintere Hälfte ist hohl. Dieser röhrenförmige Abschnitt mündet in *b* nach außen. *c* ist der Ansatz, in dem die Glasspritze eingesetzt wird. Beim Einführen dieser Nadel erhebt man mit dem Daumen und Zeigefinger eine Längsfalte der Bauchhaut einschließlich Muskulatur und Bauchfell und läßt dieselbe noch von einem Gehilfen ebenso halten. Dann sticht man die Nadel quer durch die Falte, bis die Öffnung *b* in die Mitte derselben zu liegen kommt. Nunmehr läßt man die Falte los. Die Nadel sitzt nun so, daß ihre Öffnung *b* frei in die Bauchhöhle ragt, während die Spitze sich außen befindet. Nun geschieht die Einspritzung. Nach derselben wird die Falte abermals gebildet und die Nadel entfernt.

Bei den weniger häufig vorkommenden Infektionen in die Brusthöhle führt man die Kanüle der Injektionsspritze in einem Zwischenrippenraum ein. Auch hier empfiehlt sich die Verwendung stumpfer Nadeln und die vorausgehende Anlegung einer kleinen Hautwunde, da bei diesen Impfungen sehr leicht schwere Verletzungen der Lungen und größeren Gefäße vorkommen. Auch bei dieser Art von Infektion ist das Haarkleid an der betreffenden Stelle zu entfernen und die Haut zu desinfizieren.

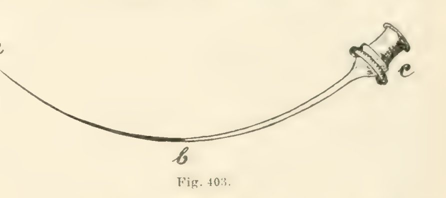


Fig. 403.

Besonders bei größeren Tieren, wie Kaninchen, bewirkt man oft eine unmittelbare Infektion der Blutbahn. Zu dem Ende spritzt man das Infektionsmaterial in eine gestaute Vene. Beim Kaninchen nimmt man dazu die äußere Ohrvene, die sich bereits bei der der Einspritzung voraufgehenden Reinigung des Ohres meistens prall mit Blut füllt. Unmittelbar vor der Impfung komprimiert man dieselbe noch an der Ohrwurzel. Dann hält man das Ohr gegen das Licht und kann so sehr leicht durch die Haut eine feine Kanüle in die Vene in der Richtung des Blutstromes einstechen.

Bei sehr stark pigmentierten Ohren ist es zweckmäßig, über der Vene ca. 2 *cm* lang die Haut vorher zu spalten. Bei kleinen Tieren präpariert man eine Vena jugularis (linke) aseptisch, klemmt sie gegen das Herz zu ab und führt die Kanüle in den gestauten Teil ein. Dann öffnet man die Sperre und spritzt ein. Vor Entfernung der Kanüle unterbindet man beiderseits von der Einstichöffnung. Das für die Einspritzung in die Blutbahn hergestellte Impfmaterial muß sehr gleichmäßig und fein in der Flüssigkeit verteilt sein, da keine größeren Krümeln und Brocken in die Gefäße eingeführt werden dürfen.

## Dosierung des Impfmateriales.

Um entweder die Widerstandskraft eines Tieres gegen eine bestimmte Infektion festzustellen oder die kleinste tödliche Dosis von einer Bakterienart für ein bestimmtes Tier kennen zu lernen, ist es notwendig, die Menge des eingeführten Impfmateriales möglichst genau abzumessen. Eine absolut genaue Dosierung desselben ist undurchführbar, sei es auf dem Wege des Wägens oder volumetrischen Messens.

Für die Bestimmung der Widerstandskraft eines Versuchstieres, gemessen an der Schwere der bei einer bestimmten Menge eingeimpften Infektionsstoffes auftretenden Krankheitserscheinungen, ist eine möglichst genaue Kenntnis der Infektionsmenge erforderlich. Diese kann nur durch Zählung der eingeführten Bakterien ermittelt werden, unter der Voraussetzung der Möglichkeit, eine genau gemessene Flüssigkeitsmenge einverleiben zu können. Mittelst folgender Methode gelangt man hier zum Ziele. Da es sich hier nicht darum handelt, eine Tötung des Tieres durch die Infektion herbeizuführen, so wählt man kleine Dosen, die nachher auf 100 *g* Körpergewicht berechnet werden. Um die Vermehrung der Bakterien in der Aufschwemmung hintanzuhalten, verwendet man als Aufschwemmungsflüssigkeit eine physiologische Kochsalzlösung und hält die Bakterienaufschwemmung vor der Injektion bei niederer Temperatur (8—10° C). Man stellt eine dünne Aufschwemmung her, die erfahrungsmäßig in einer Dosis von 1 $cm^3$ auf 100 *g* Körpergewicht das betreffende Tier noch nicht tötet. Nun wägt man 3 Versuchstiere und berechnet die Menge der zur Einspritzung kommenden Bakterienaufschwemmung, indem man auf je 100 *g* Körpergewicht für ein Tier 0·1 $cm^3$, für das zweite 0·05 $cm^3$ und für das dritte 0·01 $cm^3$ der Rechnung zugrunde legt. Zweckmäßig wählt man möglichst gleich schwere Tiere aus.

Nunmehr schreitet man zur Infektion. Das gefesselte Tier wird am Orte der Impfung geschoren, rasiert und mit 60%igem Alkohol gründlich desinfiziert. Zum Versuch verwendet man die in Fig. 404 abgebildete Einrichtung, wenn es sich um Meerschweinchen oder noch kleinere Tiere handelt. Wir sehen hier den Spritzenkörper der Injektionsspritze nach *Klemensiewicz* (vgl. S. 1279) als Bürette in ein Stativ eingeklemmt, fertig zur Injektion. Die Kulturaufschwemmung wird einfach nach Abnahme der beiden Kautschukdruckschläuche und Aufsetzen des Gummiballons durch Ansaugen gefüllt. Bei geschlossenem Glashahn wird die Kanüle mit dem Gummischlauch angesetzt, der unmittelbar hinter der Kanüle liegende Schraubenquetschhahn geschlossen, dann an Stelle des Ballons wieder der Druckschlauch angeschlossen, der mit dem Preßluftgefäß in Verbindung steht. Letzteres ist eine geräumige Flasche, die einen doppelt durchbohrten, festsitzenden Kautschukstopfen trägt und etwa 10 *cm* hoch mit Wasser gefüllt ist. Bei subkutanen Injektionen, die einen größeren Druck erfordern, ist ein Verbinden des Stopfens und der Schlauchenden mit Kupferdraht empfehlenswert. Der große Windkessel ist gewählt, weil so ein kräftiger,

gleichmäßig wirkender Druck zu erreichen ist. Durch den Stopfen geht ein bis zum Boden reichendes Glasrohr und ein kurzes, welches mit der Bürette verbunden ist. An das lange Rohr wird durch einen Schlauch ein Kautschukdoppelgebläse angeschlossen, wenn nur ein geringer Druck gebraucht wird, wie in unserem Falle einer intraperitonealen Injektion. Um ein Rücksteigen von Wasser zum Gebläse zu verhindern, ist ein Quetschhahn dazwischen gelegt. Braucht man einen großen Druck, so verwendet man eine zweite Flasche, welche unten einen Tubus besitzt, der einen durchbohrten Kautschukstopfen trägt. Die Bohrung enthält ein Glasrohr, das durch einen

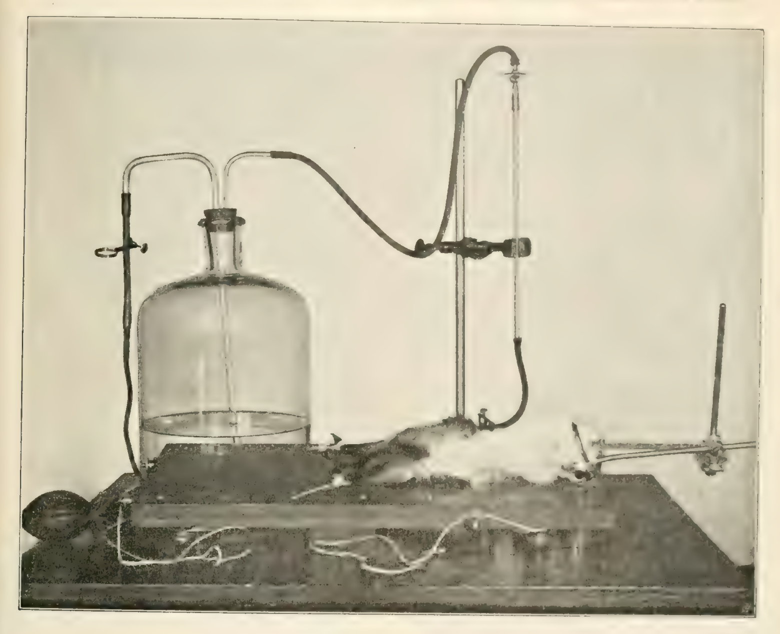


Fig. 404.

langen Schlauch mit dem langen Rohre des Preßgefäßes in Verbindung steht. Die zweite Flasche wird voll mit Wasser gefüllt und entsprechend dem gewünschten Druck hochgestellt. Fig. 405 zeigt uns diese Einrichtung für großen Druck. Kommen größere Tiere zum Versuch, wie Kaninchen etc., die infolge ihres größeren Körpergewichtes auch größere Mengen eingespritzt erhalten müssen, so verwendet man an Stelle der genannten Spritze eine Bürette mit 50 $cm^3$ Inhalt, in Zehntel geteilt. In diesem Falle legt man zwischen Druckgefäß und Bürette einen Quetschhahn. Beim Ansaugen des Impfmateriales bringt man an Stelle des Druckgefäßes eine Gaswasch-

flasche, deren bis zum Boden reichendes Glasrohr mit der Bürette verbunden wird, wie es aus der Fig. 406 ersichtlich ist. Die Waschflasche wird mit einer Permanganatlösung oder verdünnter Schwefelsäure gefüllt und hat überdies noch eine Watteeinlage, so daß jede Infektionsgefahr für den Ansaugenden beseitigt ist. Weiter wird wie oben angegeben verfahren. Nachdem man genügend Druck gegeben und ein wenig Flüssigkeit aus der Kanüle in ein Schälchen austreten gelassen hat, führt man dieselbe in der früher beschriebenen Art und Weise, entsprechend der verwendeten Infek-

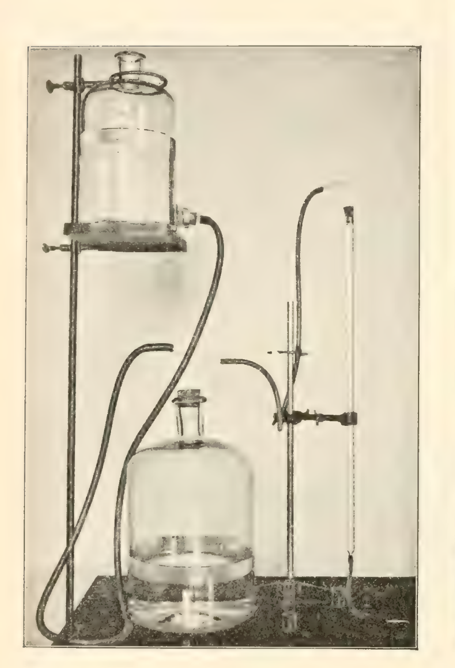


Fig. 405.

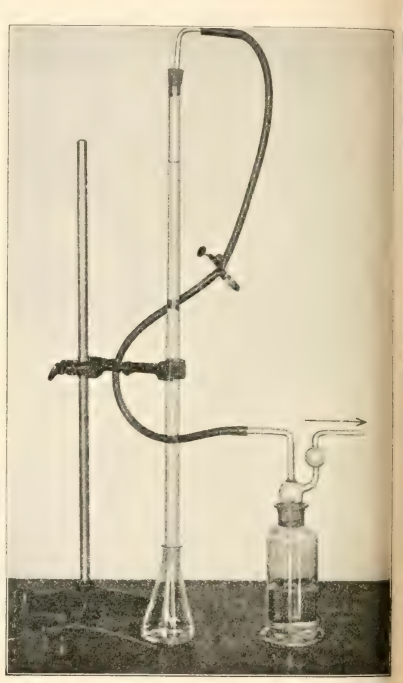


Fig. 406.

tionsmethode, ein, öffnet zuerst den Glashahn der Spritze (bei der Bürette den eingeschalteten Quetschhahn), hierauf langsam den Schraubenquetschhahn vor der Kanüle und läßt die berechnete Anzahl Kubikzentimeter einfließen. Nun verschließt man den Schraubenquetschhahn und entfernt die Kanüle aus dem Tier. Hierauf läßt man sofort aus der Kanüle $^{1}/_{100}$ *cm*³ (bei der Bürette $^{1}/_{10}$ *cm*³) Impfmaterial in ein Proberöhrchen abfließen, das 5 *cm*³ gekühlte, sterile, physiologische Kochsalzlösung enthält.

Eine zweite Portion von $^{1}/_{100}$ $cm^3$ kommt in 1 $cm^3$ 5%ige Formaldehydlösung. Verwendet man die Bürette, so bereitet man sich Erlenmeyerkolben mit 50 $cm^3$ steriler Kochsalzlösung und 10 $cm^3$ Formaldehydlösung vor, in die man je $^{1}/_{10}$ $cm^3$ Bakterienaufschwemmung einträgt. Durch gutes Umschütteln werden die Bakterien gleichmäßig verteilt. Dann gießt man mit den in der Kochsalzlösung verteilten Bakterien Platten, und zwar je eine mit 0·1, 0·5 und 1 $cm^3$, die man mit genauen Pipetten entnimmt. In den Platten werden dann die Keimzahlen bestimmt (siehe S. 1329). Impft man mehrere Tiere, so stellt man die nach jeder Infektion abgenommenen Verdünnungen für die Zählung in den Eisschrank, um eine Vermehrung zu verhüten. Dann fertigt man die Platten nach Beendigung sämtlicher Injektionen an. Die in Formalinlösung eingebrachten Bakterien werden in der Blutkörperchenzählkammer (siehe S. 1330) unmittelbar gezählt.

Eine einfache Rechnung ergibt sofort die Anzahl der jeweilig eingespritzten Bakterien. Bei unseren Verdünnungen ergibt sich für die Anzahl der eingeführten, noch vermehrungsfähigen Bakterien

$$Z = z \times 501 \times d \frac{K}{100},$$

wenn z die gezählten Bakterienkolonien bei Verwendung von 1 $cm^3$ zum Plattenguß, d die Dosis in Kubikzentimetern auf 100 $g$ Körpergewicht und K das Körpergewicht des Tieres sind.

Die Zählung der in die Formalinlösung eingebrachten Bakterien auf 1 $cm^3$ ursprünglichen Impfmateriales berechnet und mit der Anzahl der dem Tier einverleibten Kubikzentimeter Kulturaufschwemmung ($d \cdot \frac{K}{100}$ von der vorigen Formel) ergibt die Anzahl der überhaupt eingespritzten Bakterien. Die Differenz beider Bestimmungen gibt die Menge der nicht mehr vermehrungsfähigen verimpften Mikroben.

Die angegebene Methode ist sicherlich auch nicht absolut genau, immerhin liefert sie aber ein klares Bild über die Beziehungen zwischen der Schwere der Infektion und der Anzahl eingebrachter vermehrungsfähiger Bakterien. Außerdem sind hier die Fehler geringer als beim Wägen, selbst wenn dasselbe, wie es immer sein sollte, im geschlossenen Wägeglas ausgeführt wird. Bei der Wägung hat man keinen Anhaltspunkt für den Wassergehalt der Kultur, für die mitgewogenen Stoffwechselprodukte und für die Menge vermehrungsfähigen und toten Materiales. Die Wägung kann nur zur groben Orientierung und als Vorversuch in Verbindung mit der Zählung bei Dosierungen berechtigte Anwendung finden. Zudem versagt sie noch bei Flüssigkeitskulturen, die bei der obigen Methode ohne weiteres verwendbar sind.

Ein möglichst genauer Dosierungsversuch zur Bestimmung der kleinsten tödlichen Dosis einer auf künstlichen Nährsubstraten wachsenden Bakterienart, um eine solche kann es sich natürlich nur handeln, wird zweckmäßig durch eine Reihe von Vorversuchen eingeleitet, die zuerst festzustellen haben, ob die betreffende Bakterienart über-

haupt bei der beabsichtigten Infektionsmethode für die verwendete Tierart pathogen ist. Ist dies der Fall, dann wird man einen Dosierungsversuch machen mit einer abgewogenen Menge der Kultur, die durch eine bestimmte Zeit (24 Stunden) bei einer bestimmten Temperatur auf einem festen Nährboden gewachsen ist. Die Wägung nimmt man auf einer sehr genauen analytischen Wage vor, indem man etwas des Kulturrasens in ein tariertes, steriles Wägegläschen bringt, dieses sofort luftdicht verschließt und nun wägt. Hierauf pipettiert man eine beliebige, bekannte Menge physiologischer Kochsalzlösung dazu und verrührt die Bakterien sehr gut. Man berechnet nun den Gehalt von Milligrammen Kultur in dem Kubikzentimeter der Aufschwemmung. Nun bestimmt man das Gewicht der Versuchstiere und wählt solche von möglichst gleichem Gewicht aus. Nunmehr berechnet man die Menge der einzuspritzenden Aufschwemmung für 100 *g* Tierkörper. Gleich beim ersten Versuch nehme man eine größere Anzahl von Tieren und steigere die Dosis so weit, daß sicher mindestens das mit der größten Menge geimpfte eingeht. Mit der Aufschwemmung wird auch ein Zählversuch gemacht, der annähernd die 1 *mg* Kultur entsprechende Anzahl vermehrungsfähiger Bakterien zu ermitteln hat. Für die zweite Versuchsreihe, die weniger Tiere beansprucht (3—4), wählt man die durch den ersten Versuch ermittelte Dosis letalis minima als größte Gabe und stuft die Mengen in kleineren Intervallen als beim ersten Versuch ab. Der zweite Versuch kann analog dem ersten mit gewogenen, aber unter vollständig gleich gehaltenen Kulturen ausgeführt werden. Erst den dritten Versuch macht man unter Zuhilfenahme der oben mitgeteilten Zählmethode. Die hier in Betracht kommende Kulturmenge wägt man ebenfalls ab und verdünnt so weit, daß auf den Kubikzentimeter annähernd so viele vermehrungsfähige Zellen kommen, als der kleinsten tödlichen Dosis des zweiten Versuches entsprechen. Zur Berechnung verwendet man die Ergebnisse, welche die mit der Wägung verbundene Zählung des ersten Versuches ergeben hat. Dann macht man die Einspritzung in der angegebenen Weise und schließt sofort die genaue Zählung der Impfung an. Ein einfaches Beispiel wird dies sofort für alle Fälle klarstellen.

Der Wägungsversuch I hat bei der Zählung beispielsweise 100.000 Bakterien für 1 *mg* Kultur und als Dosis letalis minima 0·1 *mg* pro 100 *g* Meerschweinchenkörper ergeben. Man wird demnach eine Menge von ungefähr 2 *mg* gleichalteriger Kultur abwägen. Das Gewicht der im Wägeglas befindlichen Kulturmenge betrage 2·4 *mg*. Diese Menge wird nun mit 24 $cm^3$ physiologischer Kochsalzlösung versetzt und darin sehr gleichmäßig verteilt. Es entspricht 1 $cm^3$ dieser Aufschwemmung 0·1 *mg* Kultur, also der kleinsten tödlichen Dosis. 4 Meerschweinchen erhalten Injektionen, das erste 1 $cm^3$ auf 100 *g* Körpergewicht, das zweite 0·8 $cm^3$, das dritte 0·6 $cm^3$ und das letzte 0·4 $cm^3$. Nach jedesmaligem Impfen wird auf die oben angegebene Weise die Keimzahl bestimmt. So erhält man durch diesen Versuch schon enge Grenzen zwischen tödlicher und eben nicht tödlicher Dosis,

die noch mehr durch einen gleichen weiteren Versuch, dem der letzte zur Grundlage dient, eingeengt werden können. Dazu sei nur bemerkt, daß man zu jedem Versuch einen frischen Ableger derjenigen Kultur zu verwenden hat, die zum ersten Versuch verwendet wurde und nicht etwa einen aus den Tieren der Vorversuche gezüchteten Stamm, da entweder eine Abschwächung oder Steigerung der Virulenz eingetreten sein könnte.

Die aus dem mit der kleinsten tödlichen Dosis eingegangenen Tier gezüchteten Kulturen finden nur bei den Virulenzsteigerungsversuchen Verwendung. Hier führt man die Dosierung gleich aus, doch mit Verwendung der aus den Tieren der Vorversuche gewonnenen Kulturen.

Werden für die genannten Experimente flüssige Kulturen verwendet, so verdünnt man eine bestimmte Anzahl Kubikzentimeter derselben mit einer genau gemessenen Menge physiologischer Kochsalzlösung. Dann wird wie mit den Aufschwemmungen verfahren und natürlich nur die Zählung nach jeder Impfung unmittelbar in Formalin und durch die Platte vorgenommen.

## Beobachtung und Sektion.

Die infizierten Tiere werden genau beobachtet und alles Auffällige im Protokoll vermerkt. So ist besonders auf das Abnehmen der Freßlust und das Benehmen des Tieres zu achten. Besonderes Augenmerk ist auf das Aussehen und Verhalten der Impfstelle zu richten. Dann müssen tägliche Bestimmungen des Körpergewichtes, der Temperatur gemacht werden. Bei letzterer ist zu bemerken, daß sie auch normal bei vielen kleinen Säugern großen Schwankungen unterliegt. Temperaturmessungen werden im Rektum gemacht. Will man sich über das Verhalten der eingespritzten Bakterien in der Blutbahn orientieren, wird man bei kleinen Tieren aus kleinen Wunden des gut gereinigten und desinfizierten Ohres Blut entnehmen. Am besten ist es, nach Entfernung des Desinfektionsmittels mit ausgekochtem, sterilem Wasser mit der sterilen Schere ein kleines Stückchen Ohr abzukappen. Das zuerst ausgetretene Bluttröpfchen wird herabfallen gelassen, die übrigen mit der Öse aufgefangen und teilweise auf Nährsubstrate verimpft, teilweise mikroskopiert. Bei größeren Tieren präpariert man aseptisch am Ohr oder an den Extremitäten kleinere Gefäße und entnimmt aus ihnen die Blutprobe. Wird viel Blut gebraucht, so legt man die Carotis frei, klemmt ab, bindet eine Kanüle ein und läßt durch diese das Blut in die sterile Proberöhre fließen.

Die entweder in einem bestimmten Stadium der Infektion durch Nackenschlag oder Chloroform getöteten oder spontan eingegangenen Tiere werden der Sektion unterworfen. Für dieselbe wird das Tier möglichst bald nach dem Tode auf einem gewöhnlichen Brett aus weichem Holz, auf das einige Lagen Filtrierpapier gelegt werden, durch Festnageln der vier Extremitäten in Rückenlage gespannt. Wenn es sich um Pest-

versuche handelt, verwendet man Blechtassen, die Klammern zum Festhalten des Tieres besitzen und samt dem Tier nach Beendigung der Sektion in einen Blechbehälter kommen, der mit Wasser gefüllt und verschlossen wird. Samt Inhalt kommt derselbe zur Desinfektion in einen größeren Autoklaven. Für die übrigen Infektionsversuche genügt es, das Brett mit dem aufgespannten Tier noch auf eine Blechtasse zu legen. Nun befeuchtet man das Haarkleid des Tieres mit Wasser, rasiert die Bauchseite des Kadavers und desinfiziert sie mit 60%igem Alkohol. Zur Sektion gebraucht man 1 Skalpell, 1 größere Schere, 1 kleine Schere, 2 Federzangen und für besondere Zwecke noch eine Knochenzange. Diese Geräte sterilisiert man vor dem Gebrauch durch Auskochen in Wasser und stellt sie in ein Glas mit 60%igem Alkohol so, daß die Griffe herausschauen. Hinein kommen auch die während der Sektion beschmutzten Instrumente zur vorläufigen Reinigung. Vor dem jeweiligen Gebrauch wird der Alkohol über der Flamme verdunstet. Vielfach glüht man die Instrumente einfach in der Bunsenflamme aus. Davon ist abzuraten, da dieselben sehr schnell zugrunde gehen, dann elend schneiden und in heißem Zustande schlecht zu handhaben sind. Man mache es sich zur Regel, mit den Fingern das Tier überhaupt nicht zu berühren und dasselbe nur mit Zangen zu fassen. Bei sehr großen Tieren ist man gezwungen, mit den Händen zuzugreifen. In diesem Falle bediene man sich dichter Gummihandschuhe, wie bei pathologisch-anatomischen Leicheneröffnungen am Menschen. Auf den Seziertisch gehören noch einige Röhrchen mit Nährsubstraten, eine Platinnadel und Öse, 10 gereinigte Objektträger, auf einem Brettchen aufgelegt, ein weithalsiges Glas mit starkem Alkohol, ein Bunsenbrenner und ein Glasschreibstift.

Nach der Sektion ist es bei Verwendung eines weichen Brettes am besten, das Tier samt demselben zu verbrennen. Größere Laboratorien besitzen eigene Verbrennungsöfen. Kleinere, einzelne Tiere (wie Kaninchen und Meerschweinchen) können auch in größeren Zimmeröfen verbrannt werden. Ist mangels einer Verbrennungsgelegenheit eine Beerdigung notwendig, dämpfe man Kaninchen und große Meerschweinchen durch mindestens 4 Stunden im Dampftopf oder halb so lange im Autoklaven vor dem Eingraben. Die Blechtassen, die übrigens bei richtig ausgeführter Sektion nicht beschmutzt sein dürfen, werden mit Lysol oder Lysoform desinfiziert. Das verwendete Instrumentarium wird zuerst in $^5/_4$%iger Sodalösung ausgekocht und dann mechanisch gründlich gereinigt.

Die Sektion und Abimpfung von einem intraperitoneal infizierten Meerschweinchen wird folgendermaßen ausgeführt: Am gespannten und desinfizierten Tier wird ungefähr in der Mitte der Medianlinie eine Hautfalte mit der Federzange aufgehoben und mit der Schere eingeschnitten. Von dieser Öffnung aus durchtrennt man unter Mithilfe der Federzange mit der Schere, die stumpfe Spitze derselben vorschiebend, die Haut bis zum Kinn und bis zur Symphyse. Dann präpariert man die Haut seitlich

mit dem Messer ab, bis etwa zur Achselhöhle an der Brust und am ganzen Bauch. Die abgehobene Haut spaltet man durch einen zum ersten Schnitt senkrechten, der ungefähr die Mittellinie des Tieres halbiert. Dann werden die so erhaltenen 4 Hautlappen zurückgeschlagen. Nunmehr sengt man die etwa ins Operationsfeld gefallenen Haare mit dem Bunsenbrenner ab und eröffnet zuerst vorsichtig die Brusthöhle, ohne das Herz zu verletzen. Zu dem Ende durchtrennt man durch einen Scherenschlag das Brustbein oberhalb des Zwerchfellansatzes bis zu den Rippen. In die Spalte eingehend, durchtrennt man nun mit der Schere die Rippenknorpel bis zum Schlüsselbein beiderseits. Das freigelegte Brustbein wird zurückgeschlagen. Mit der sterilen Pinzette faßt man die Herzspitze und geht mit der glühenden, kleinen Platinöse in den rechten Vorhof ein. Mit dem erhaltenen Blutstropfen legt man Kulturen an, eventuell entnimmt man noch einen zweiten Tropfen. Die Kulturen werden als H.-B.-(Herzblut-)kulturen bezeichnet. Auch auf einem Objektträger streicht man einen Blutstropfen aus und bezeichnet ihn mit dem Farbstift. Dann wird ein Ausstrich von der Flüssigkeit der Brusthöhle gemacht. Mit der Schere wird ein kleines Stück Lunge abgekappt und damit ein Ausstrich auf einem Objektträger gemacht. Ein zweites kleines Lungenstück kommt in die Flasche mit Alkohol, ohne aber den Hals oder Stopfen damit zu berühren. Nunmehr schreitet man zur Eröffnung der Bauchhöhle, die wieder am besten mit der Schere, von einer kleinen Wunde aus, geschieht. Man hebt mit der Federzange eine Falte der Muskulatur samt Peritoneum auf und zwickt hier ein. Dann geht man mit dem stumpfen Scherenteil ein und durchtrennt der Länge nach unter Mithilfe der Federzange die Bauchmuskulatur einschließlich Peritoneum. Dann durchtrennt man die Bauchdecken quer und schlägt die 4 Lappen zurück. Hierauf hebt man ohne Darmverletzung die Gedärme auf die rechte Seite des Tieres und reißt mit der Federzange von der zutage getretenen Milz ein Stück ab, von dem man mit der Platinnadel auf einen Nährboden abimpft und auf Objektträgern Ausstriche verfertigt. Auch von der Flüssigkeit der Bauchhöhle (Peritonealsaft — P. S.) wird mit der Öse eine Abimpfung gemacht und ein Ausstrich. Ein Stück Milz wird in Alkohol eingelegt. Nunmehr fertigt man noch Ausstriche auf Objektträgern von der Leber und der Niere und legt Stücke derselben in Alkohol.

Es braucht wohl nicht betont zu werden, daß auf die Veränderungen der einzelnen Organe sehr zu achten ist. Außerdem betrachte man genau die Veränderungen an den Lymphdrüsen in der Achselhöhle des Tieres, die schon bei der Präparation der Haut sichtbar werden. Man kann von ihnen auch Abimpfungen machen, soll bei Vergrößerung derselben mindestens Ausstrichpräparate anfertigen. Wird die Sektion unterbrochen, so ist der Kadaver sofort mit einer Glasglocke (bei kleinen Tieren) oder mit einem fliegensicheren Drahtsturz zu bedecken.

Die angegebene Sektionstechnik wird natürlich nach dem Zweck abgeändert und den Verhältnissen angepaßt, paßt aber in den Grundzügen für die meisten Fälle. Hauptsache dabei ist, während der ganzen Sektion

keine fremden Bakterien in die Organe zu bekommen. Daher zuerst Abimpfung des Herzblutes, dann erst Eröffnung der immerhin leichter verunreinigten Bauchhöhle, und auch hier sofortige Abimpfung, ohne viel die Därme mit der Zange zu berühren und hin- und herzuschieben. Die aus der Bauchhöhle gewonnenen Kulturen verwende man nur dann, wenn aus dem Blute keine zu erhalten waren. Aber dann prüfe man sie vor der Weiterverwendung gründlich auf ihre Reinheit.

## VIII. Gewinnung und Züchtung pathogener Mikroben.

Im folgenden ist die Gewinnung und Züchtung einer Anzahl pathogener Bakterien angegeben, die zwar häufig vorkommen, aber doch bei ihrem Wachstum besondere Nährsubstrate oder äußere Bedingungen fordern. Von einer Vollständigkeit in bezug auf alle pathogenen Bakterien kann hier nicht die Rede sein. Für die Gewinnung und Züchtung sind nur wenige Methoden angegeben, diese führen aber sicher zum Ziele, wenn sie auch nicht neuesten Datums sind.

Die Beschreibung der Bakterienarten mußte weggelassen werden, da es sich hier doch nur um eine gekürzte Wiedergabe derselben aus Handbüchern handeln könnte. Außerdem ist eine kurze Beschreibung zur Bestimmung und Erkennung einer bestimmten Bakterienart unzureichend. Schon an dieser Stelle sei auf das Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von *Kolle* und *Wassermann* hingewiesen, das eine genaue Diagnose der pathogenen Mikroben enthält und überdies eine reiche Spezialliteratur bringt.

In vielen Fällen ist es zweckmäßiger, sich für eine bestimmte Untersuchung die betreffende Mikrobenart von einem bakteriologischen Laboratorium zu verschaffen. In diesem Falle überimpfe man die einlangenden Kulturen sofort auf einen frischen, passenden Nährboden. Außerdem sind sofort einige Tierversuche anzustellen, bzw. die Bakterienart durch ein empfängliches Tier zu schicken, um sie möglichst schnell wieder virulent zu haben.

Betreffend den Aufenthalt der Kulturen beim Temperaturoptimum sei hervorgehoben, daß man ganz allgemein nie länger dieselben bei optimaler Wärme züchtet, als bis eine reichliche Vermehrung stattgefunden hat. Dazu werden, von einigen Ausnahmsfällen abgesehen, meistens 2 bis 3 Tage hinreichen. Dann kommen die Kulturen sofort in einen lichtdichten Kasten von Zimmertemperatur. Sehr gut ist es, die Wattebäusche mit einer Kautschukklappe zu überziehen, um eine Austrocknung und Eindickung des Nährsubstrates möglichst hintanzuhalten. Sämtliche Kulturen sind vollständig dunkel zu halten.

Auf jeder Kulturröhre soll vermerkt sein: Der Name der Bakterienart, Tag und Stunde der Abimpfung und bei Ablegern aus Tierversuchen eine Angabe über den Ort der Entnahme des verimpften Materials (Herzblut, Lungensaft, Milzsaft etc.).

### Micrococcus meningitidis cerebrospinalis.

Die Gewinnung geschieht aus dem meningitischen Exsudat, das zu Agarserumplatten verarbeitet oder auf solchen Platten ausgestrichen wird. Es wird ein 2%iger dextrosehaltiger Nähragar von neutraler Reaktion im Verhältnis von 2:1 mit menschlichem Blutserum bei 40° C gemischt und dann darauf verimpft. Das Temperaturoptimum liegt bei 36—37° C.

Von den Versuchstieren erweist sich am empfänglichsten die weiße Maus. Man injiziert eine große Kulturmenge intrapleural oder in die Bauchhöhle. Die neuen Kulturen werden aus dem Exsudat der Brust- bzw. Bauchhöhle angelegt.

Auch auf den übrigen eiweißhaltigen Nährsubstraten, wie neutralem Nähragar, Nährbouillon, Milch und Kartoffel, findet meistens ein ziemlich gutes Wachstum statt. Um aber sicher zu gehen, empfiehlt sich die Verwendung des erstgenannten Nährbodens.

Bezüglich der Morphologie, Physiologie und Diagnostik dieser Bakterienart sei auf die zusammenfassende Abhandlung von *Weichselbaum*[1]) und *Kutscher*[2]) verwiesen, wo sich auch eine erschöpfende Literatur findet.

### Micrococcus aureus *(Rosenbach)* Mig. (Staphylococcus pyogenes aureus [*Rosenbach*]).

Auf der menschlichen Haut und den Haaren findet sich diese Kokkenart sozusagen regelmäßig. Außerdem in Luft, besonders von Ställen und Krankenräumen. Zur Gewinnung kann man Hautschüppchen in sterilem Wasser verreiben und zu Gelatineplatten verarbeiten. Er findet sich sehr häufig in Hautabszessen, aus denen er in der gleichen Weise isoliert wird. Er wächst auf allen eiweißhaltigen Nährsubstraten sehr gut und verlangt zu seinem optimalen Gedeihen eine alkalische Reaktion derselben. Nach *Deelemann*[3]) kann als Optimum ein Zusatz von 0·78 $cm^3$ Normalsodalösung bzw. 0·68 $cm^3$ Normalnatronlauge auf 100 $cm^3$ Nährsubstrat gelten, das vorher neutralisiert wurde (Lackmuspapier als Indikator). Um einigermaßen sicher einen pyogenen Aureus zu erkennen, empfiehlt sich immer die Untersuchung auf Hämolysinbildung, die bei den pathogenen Formen mehr oder minder stark auftritt, niemals aber vollständig fehlen soll.

Für Tierversuche verwendet man Kaninchen, denen 24stündige Bouillonkulturen intravenös eingespritzt werden. Bei mittelgroßen Kaninchen tritt der Tod nach 4—10 Tagen ein, wenn eine virulente Bouillonkultur in einer Menge von ca. $^1/_{10}$ $cm^3$ in eine Vene injiziert wird. Abgeimpft wird von den Organen, die herdförmige Infektionsstellen enthalten.

---

[1]) *A. Weichselbaum,* Meningokokken mit besonderer Berücksichtigung anderer bei akuter Meningitis gefundener Mikroorganismen. IV. Micrococcus meningitidis cerebrospinalis. *Kolle* und *Wassermann,* Handbuch der pathog. Mikroorganismen Bd. 3. S. 268. Fischer, Jena (1902).

[2]) *K. H. Kutscher,* Epidemische Genickstarre. *Kolle* und *Wassermann,* Handb. d. path. Mikroorg. Ergänzungsbd. 1. S. 454. Fischer, Jena (1907).

[3]) *M. Deelemann,* Der Einfluß der Reaktion des Nährbodens auf das Bakterienwachstum. Arbeiten a. d. kais. Gesundheitsamt. Bd. 13. S. 374 (1897).

Solche findet man häufig in der Niere. Micrococcus aureus muß oft überimpft werden, wenn er durch längere Zeit virulent und vermehrungsfähig erhalten werden soll.

Micrococcus gonorrhoeae *(Neisser) Flügge.* (Gonococcus Neisser.)

Zur Gewinnung desselben verwendet man möglichst frischen, aus der Urethra stammenden Trippereiter, in dem die mikroskopische Untersuchung den gewünschten Mikroben in großer Menge erkennen ließ.

Der beste Nährboden ist ein Agar-Blutserumgemisch nach *Wertheim*[1], das erhalten wird durch Vermischen von auf 40° C abgekühltem Fleischwasser-Pepton-Agar mit auf dieselbe Temperatur erwärmtem, flüssigem, sterilem Serum des Menschenblutes im Verhältnis von 2:1 (eventuell 3:1). Nach raschem Mischen durch Heben und Senken des Röhrchens wird das Nährsubstrat in schräger Lage zur Erstarrung gebracht.

Die Isolierung des Mikroben aus dem Eiter kann entweder durch den Agarplattenguß oder durch Ausstreichen vorgenommen werden. Nach *Wertheim*[2] wird der Plattenguß in folgender Weise ausgeführt: Die eine bestimmte Menge menschlichen Blutserums enthaltenden Proberöhrchen werden mit dem Eiter infiziert, davon 2 Verdünnungen angelegt und sämtliche Proben in ein Wasserbad von 40° C (nicht höher!) gebracht. Dann wird verflüssigter Fleischwasserpeptonagar auf die gleiche Temperatur abgekühlt und in doppelter bis dreifacher Menge zugesetzt. Die Flüssigkeit wird rasch gemischt und in Petrischalen ausgegossen. Die Züchtungstemperatur liegt bei 36° C.

Nach *Kiefer*[3]) verarbeitet man den Eiter nicht zu Platten, sondern streicht ihn auf Agarserumplatten aus, noch besser auf schräg erstarrtes Agar-Serum-Gemisch.

Wo die Beschaffung menschlichen Blutserums auf Schwierigkeiten stößt, kann man dasselbe nach *Kiefer*[3]) durch filtrierte Aszitesflüssigkeit des Menschen ersetzen, die bei 62° C im Proberöhrchen diskontinuierlich sterilisiert wird. Nach dem genannten Autor verwendet man einen Agarnährboden von folgender Zusammensetzung: $3^1/_2$% Agar, 5% Pepton, 2% Glyzerin und 0·5% Kochsalz. Nach Abkühlen desselben auf 50° werden gleiche Teile Aszitesflüssigkeit und Agar gemischt und in Petrischalen (oder Proberöhrchen schräg) erstarren gelassen.

Als flüssiger Nährboden ist zu empfehlen eine Bouillon, die analog dem *Wertheim*schen Serumagar zusammengesetzt ist, demnach eine Mischung von 1 Teil menschlichem Blutserum und 2—3 Teilen Fleischwasserbouillon. Auch hier kann das menschliche Serum durch Aszites-

---

[1]) *E. Wertheim,* Die aszendierende Gonorrhöe beim Weibe. Bakteriologische und klinische Studien zur Biologie des Gonococcus Neisser. Archiv f. Gynäkologie. Bd. 42. H. 1 (1892).

[2]) *E. Wertheim,* Reinzüchtung des Gonococcus Neisser mittelst des Plattenverfahrens. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 50 (1891).

[3]) *Kiefer,* Zur Kultur des Gonococcus Neisser. Berliner klin. Wochenschr. Nr. 15 (1895).

flüssigkeit etc. bis zu einem gewissen Grade ersetzt werden, wenn sie auch keinen vollen Ersatz bietet (vgl. auch *Neisser* und *Scholtz*[1]).

Da die Lebensfähigkeit des Micrococcus gonorrhoeae auf den künstlichen Nährsubstraten nur eine sehr kurze ist, so ist zur Erhaltung der Kulturen mindestens jeden 6. Tag eine Überimpfung auf einen frischen Serumnährboden vorzunehmen.

### Pseudomonas aeruginosa *(Schröter)* Mig. (Bacillus pyocyaneus).

Wegen der großen Verbreitung dieses Mikroben in der Natur ist es nicht allzu schwierig, denselben in Reinkulturen zu erhalten. Er gedeiht auf allen neutralen Nährböden und kann mit dem Gelatineplattenverfahren ohne weiteres aus seinen Hauptfundstätten erhalten werden. Dies sind Dünger und Jauche, besonders solche aus Schweineställen. Außerdem bekommt man mitunter den charakteristisch gelbgrün gefärbten und eigentümlich riechenden Pyocyaneuseiter als Ausgangsmaterial. Daraus geschieht die Gewinnung ebenso. Anfangs verflüssigen die Kolonien die Gelatine langsam, später rapid. Das Temperaturoptimum liegt bei 35° C.

Für Tierversuche eignen sich vor allem Meerschweinchen, die intraperitoneal oder subkutan infiziert werden. Besonders empfindlich sind sie gegen den ersteren Infektionsmodus.

In feuchten Agarkulturen bleiben die Zellen der Pseudomonas aeruginosa sehr lange Zeit vermehrungsfähig, wenn sie bei Zimmertemperatur im Dunkeln und geschützt vor Vertrocknen aufbewahrt werden. Es genügt in diesem Falle eine Abimpfung von 4 zu 4 Monaten.

### Bacillus coli Escherich.

Der Kolonbazillus ist auf allen üblichen Laboratoriumsnährböden leicht zu züchten und hat sein Temperaturoptimum bei 35—37° C. Entsprechend seinem ständigen Wohnsitze empfiehlt sich die Gewinnung aus Fäzes der Säuger. Feste Fäzes werden mit sterilem Wasser zu einem dünnen Brei verrührt oder zerrieben und diese Aufschwemmung zu Gelatineplatten verarbeitet, die bei 20—22° C gehalten werden. Man verwendet Traubenzuckernährgelatine. Schon nach 24 Stunden zeigen sich die blattförmigen, weißen, derben Auflagerungen des Bacillus coli. Auch hier muß nach Reinkultivierung der Kolonien, die für unsere Bakterienart charakteristisch sind, eine Reihe von Züchtungen gemacht werden, die die Diagnose „Bacillus coli" sicherstellen müssen. Bezüglich der Differentialdiagnose sei auf die Ausführungen von *Pfaundler*[2]) verwiesen, wo sich auch die einschlägige Spezialliteratur findet.

Die weitere Züchtung geschieht auf Nähragar mit Zuckerzusatz ohne Anwendung eines besonderen Spezialnährsubstrates.

---

[1]) *A. Neisser* und *W. Scholtz*, Gonorrhöe. *Kolle* und *Wassermann*, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Bd. 3. S. 148. Fischer, Jena (1903). Dort auch Diagnose und reiche Literatur.

[2]) *M. Pfaundler*, Morphologie und Biologie des Bacterium coli commune. *Kolle* und *Wassermann*, Handb. d. pathogenen Mikroorganismen. Bd. 2. S. 337. Fischer, Jena (1903).

Für Infektionen mit Bacillus coli erweisen sich besonders empfänglich Meerschweinchen und Kaninchen, denen am besten frisch aus Stuhl gezüchtete Bakterien in größerer Dosis in die Bauchhöhle eingespritzt werden. Besonders wirksam sind 24—48stündige Bouillonkulturen. Zur Abimpfung auf Bouillon verwendet man etwas vom Peritonealsaft oder von Nierenstückchen des eingegangenen Tieres.

## Bacillus suipestifer.

Der Erreger der Schweinepest ist in bezug auf die Nährsubstrate durchaus nicht wählerisch. Er wächst auf allen üblichen Laboratoriumsnährböden, einerlei ob dieselben neutral, leicht sauer oder alkalisch sind. Auch die Züchtungstemperatur spielt keine große Rolle, denn sie gedeihen zwischen 22 und 38° C ausgezeichnet.

Als besondere Fundstätten für die Gewinnung des Bacillus suipestifer seien hervorgehoben die Milz und die Mesenterialdrüsen an Schweinepest erkrankter Schweine. In sehr rasch verlaufenden Fällen gelingt mitunter die Reinzucht auch aus dem Herzblute des eingegangenen Tieres. Um sicher zu gehen, gieße man aber immer auch Platten bzw. stelle man Abimpfungen auf Nähragar her, von dem Milz- und Drüsensaft.

Zu Tierversuchen eignen sich von den kleinen Versuchstieren am besten die weiße Maus, das Meerschweinchen und Kaninchen. Besonders empfänglich sind letztere, die nach subkutaner Injektion sehr kleiner Kulturmengen ($^1/_{100}$ $cm^3$ Bouillonkultur) innerhalb von 3—6 Tagen verenden. Die üppigsten Kulturen erhält man vom Milzsafte, während aus dem Herzblut gewöhnlich nur wenige Kolonien angehen. Mäuse infiziert man ebenfalls subkutan. Der Tod derselben erfolgt innerhalb von 4 bis 7 Tagen. Die Abimpfungen erfolgen von der Milz. Fast ebenso empfänglich wie das Kaninchen für die Infektion mit Schweinepestbazillen ist das Meerschweinchen, das sowohl nach subkutaner als auch intraperitonealer Injektion von frischen Kulturen des Bacillus suipestifer innerhalb einiger Tage zugrunde geht. Auch hier impft man am besten von der Milz ab, verwendet aber nicht zu spärliche Milzmengen zur Übertragung auf schräg erstarrten Nähragar.

Die Bazillen der Schweinepest werden leicht in Kulturen wachstumsfähig und virulent erhalten, wenn dieselben vor Licht geschützt aufbewahrt werden. Es genügt eine Übertragung von 2 zu 2 Monaten auf frische Nährböden, wenn man sicher gehen will.

Über die Biologie und Morphologie des Bacillus suipestifer vgl. *E. Soest*, Schweinepest, in *Kolle* und *Wassermann*, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Bd. **3**. S. 622. Hier auch sehr viel Literatur.

## Bacillus typhosus Gaffky.

Für die Gewinnung des Typhusbazillus aus der Typhusleiche empfiehlt sich als Ausgangsmaterial die Milz, die als klassische Fundstelle angegeben werden kann. Mit dem Milzsaft können bei aseptischer

Entnahme bald nach dem Tode unmittelbar Röhrchen mit Nähragar beimpft und bei 37° C gehalten werden. So kommt man meistens zu einer Reinkultur, die der Sicherheit wegen noch einmal durch eine Gelatineplatte geschickt wird. Hierzu verwendet man die gewöhnliche Nährgelatine. Die Platten werden bei 20—22° C gehalten. Schon schwieriger gelingt die Gewinnung von Typhusbazillenreinkulturen aus den Stuhlentleerungen Erkrankter. Am besten gelingt dieselbe aus dünnflüssigen oder breiigen Entleerungen, die entweder zu den üblichen Verdünnungsplatten verarbeitet werden oder mit denen Oberflächenausstriche auf erstarrter Nährgelatine oder -Agar gemacht werden. Bei Agarnährböden ist darauf zu achten, daß die Oberfläche frei von Kondenswasser ist, was man leicht dadurch erreicht, daß man die Platten etwas im Brutschrank austrocknen läßt und dann erst verarbeitet. Die zarten und bläulich irisierenden kleinen Kolonien entsprechen meistens denjenigen des Typhusbazillus. Eine Verwechslung mit alkalibildenden Bakterienarten und atypisch wachsenden Colibazillen kann sehr leicht vorkommen, weshalb eine sehr genaue Prüfung der gewonnenen Kulturen durch verschiedene Züchtungsmethoden im Verein mit der Agglutinationsprobe vorgenommen werden muß. Es würde zu weit führen, hier die gesamte bakteriologische Typhusdiagnose auszuführen, weshalb diesbezüglich auf die Ausführungen *F. Neufelds*[1]) in *Kolle* und *Wassermanns* Handbuch der pathogenen Bakterien verwiesen sei.

Auch aus dem Gewebesaft der Roseolen Typhuskranker gelingt meistens die Gewinnung von Reinkulturen des Typhusbazillus. Nach den Untersuchungen von *Neufeld*[2]) dient zur Gewinnung der ersten Kultur, die mitunter noch Verunreinigungen enthält, ein flüssiger Nährboden, Nährbouillon oder das mit Bouillon vermehrte Kondenswasser von Röhrchen mit schräg erstarrtem Nähragar. Nach dem genannten Autor wird die den Roseolafleck tragende „Hautstelle ohne starkes Drücken und Reiben mit einem in Alkohol und Äther getauchten Wattebausch gereinigt, alsdann mit einem spitzen Skalpell oder einer Impflanzette ein seichter Einschnitt in die Roseola gemacht; nun kratzt man, bevor noch der erste Blutstropfen hervordringt, mit der Spitze desselben Messers etwas Gewebssaft aus der kleinen Wunde heraus und bringt diesen sofort in Bouillon; aus dem Röhrchen bringt man mit der Messerspitze einige Tropfen Bouillon auf die Wunde, um die hervorquellenden Blutstropfen sogleich zu verdünnen; dieselben werden dann ebenfalls in Bouillon oder in das Kondenswasser von Agarröhrchen, wie oben beschrieben, verimpft.“ Man verwende möglichst frisch angegangene Roseolaflecke und verarbeite immer mehrere Roseolen in der angegebenen Weise.

---

[1]) *F. Neufeld,* Typhus. *Kolle* und *Wassermanns* Handb. d. pathog. Mikroorganismen. Bd. 2. S. 204. Fischer, Jena (1903). Hier auch Literatur über die wichtigsten diagnostischen Methoden mit kurzer Angabe derselben.

[2]) *F. Neufeld,* Über die Züchtung der Typhusbazillen aus Roseolaflecken, nebst Bemerkungen über die Technik bakteriologischer Blutuntersuchungen. Zeitschr. f. Hyg. und Infektionskh. Bd. 30. S. 498 (1899).

Hier angeführt sei noch die Methode von *Schmiedicke*[1]), bei der die vorher gereinigte Roseolenhaut über dem Fleck unblutig abgeschabt wird. Die schichtenweise abgekratzten Gewebsteile kommen in Nährbouillon. Nach dem Auswachsen der Bakterien werden von der Bouillonkultur zur Gewinnung von Reinkulturen Platten gegossen, was auch für die *Neufeld*sche Methode gilt.

Die weitere Züchtung der gewonnenen Reinkulturen gestaltet sich sehr einfach auf dem üblichen Nähragar oder Bouillon, wobei jedoch bemerkt sei, daß eine allwöchentliche Überimpfung auf einen frischen Nährboden geboten ist. Das Temperaturoptimum für die Züchtung liegt bei 35—37° C.

Für die Tierpassage eignen sich Meerschweinchen, die mit größeren Dosen (3—5 *mg* auf 100 *g* Körpergewicht) intraperitoneal geimpft werden. Kulturen werden vom Herzblut, dem Milzsaft und dem Peritonealexsudat angelegt.

## Bacillus oedematis Liborius.

Der Ödembazillus ist weit verbreitet und findet sich vornehmlich in den oberen Schichten von Gartenerde, im Zimmerstaub, im stehenden fauligen Wasser und im Darminhalt von Pflanzenfressern. Er ist obligat anaërob und ist deshalb in der Wasserstoff- oder Kohlensäureatmosphäre zu züchten oder in Stichkulturen in hoher Schicht. Als Nährsubstrate finden Verwendung neutrale, traubenzuckerhaltige Nährbouillon, eben solche Gelatine und solcher Agar. Bedeutend verbessert wird das Wachstum durch Zusatz von 0·3 bis 0·5% ameisensauren Natrons. Das Temperaturoptimum liegt bei 35—37° C.

Entsprechend dem natürlichen Infektionsmodus wird bei der Gewinnung dieser Bazillen aus den obgenannten Substraten in der Weise verfahren, daß man eine kleine Quantität davon einer weißen Maus subkutan einverleibt. Unmittelbar nach dem Tode des Tieres impft man vom Herzblut ab und schickt die erhaltenen Kulturen dann durch die Platte. Soll von einem an malignem Ödem gefallenen größeren Tier (Pferd) eine Reinzucht gewonnen werden, so verwendet man zur Aussaat steril entnommene Ödemflüssigkeit, da sich kurz nach dem Tode im Blut und in den inneren Organen keine Bazillen finden. Liegt der Kadaver schon über 12 Stunden, so sind bereits sämtliche Organe davon überschwemmt.

Sehr geeignet für Tierversuche ist auch das Meerschweinchen, das besonders in der Jugend eine außerordentliche Empfindlichkeit für Ödembazillen zeigt. Die Impfung geschieht auch hier subkutan.

Bezüglich der Literatur und Diagnostik sei auf die zusammenfassende Darstellung von *Jensen*[2]) verwiesen.

[1]) *F. Neufeld*, Typhus. *Kolle* und *Wassermanns* Handb. d. pathog. Mikroorganismen. Bd. 2. S. 248, Fischer, Jena (1903).

[2]) *C. O. Jensen*, Malignes Ödem. *Kolle* und *Wassermanns* Handb. d. pathog. Mikroorganismen. Bd. 2. S. 619. Fischer, Jena (1903).

## Bacillus tetani Nicolaier.

Als Hauptfundstelle für diesen Bazillus kann Gartenerde und gedüngtes Ackerland gelten. Die Isolierung aus den genannten Proben geschieht am besten unter Einschaltung eines Tierversuches, zu dem Kaninchen oder Meerschweinchen verwendet werden. Am rasierten Rücken (auch Bauch) des betreffenden Tieres hebt man eine Hautfalte auf und schneidet sie mit der Schere ein. Dann macht man mit einem Spatel oder Glasstab eine Hauttasche, in die man einige Gramm Erde einfüllt und hierauf durch eine Naht verschließt. Schon nach 1—2 Tagen zeigen sich bei gelungener Infektion die ersten Tetanussymptome an den in der Nähe der Impfstelle gelegenen Muskeln, die starr werden. Sofort nach dem Tode des Versuchstieres eröffnet man den Eiterherd an der Impfstelle und streicht mit der Platinöse davon etwas auf schräg erstarrtem Nähragar aus, entsprechend dem Verfahren von *Kitasato*.[1] Die beschickten Röhrchen werden bei 37° C 1—2 Tage gehalten. Diese Mischkulturen werden nun $^3/_4$—1 Stunde lang im Wasserbad auf 80° C erhitzt und nachher zu Gelatine- oder Agarplatten verarbeitet. Zu beachten ist, daß die so von den vegetativen Bakterien gereinigten Tetanusbazillensporen in einen sauerstofffreien Nährboden kommen. Zu dem Ende werden die Gelatineröhrchen im Dampftopf unmittelbar vor der Verimpfung durch $^1/_2$—1 Stunde gekocht, dann auf 40° abgekühlt, verimpft und zu Platten rasch verarbeitet. Diese kommen in den auf S. 1244 beschriebenen Zuchtapparat für Anaëroben. Am besten ist es, in der Wasserstoffatmosphäre zu züchten. Das Wachstum bei 22° C auf Gelatine ist sehr langsam, denn erst nach ca. 5—6 Tagen sind die ersten kleinen Kolonien zu sehen. Dieselben sind wenig durchscheinend, im Zentrum dicht und von einem feinen Strahlenkranz umsäumt. Die Gelatine wird langsam verflüssigt. Von den Kolonien werden im hohen Agar Stichkulturen angelegt, die bei 37° C gehalten werden. Nach *Kitasato* eignet sich zur Zucht besonders leicht alkalischer Nähragar mit einem Zusatz von 2% Dextrose. Das gleiche gilt für Nährgelatine und Bouillon.

Zur raschen Gewinnung von Sporen in größerer Menge züchtet man den Bazillus in zuckerfreier Bouillon oder auf Blutserum (vgl. *Lingelsheim*[2]). Die Sporen sind sehr widerstandsfähig und halten sich, vor Licht geschützt aufbewahrt, jahrelang im Laboratorium entwicklungsfähig und virulent. Es empfiehlt sich, dieselben zur Aufbewahrung an Seidenfäden, sterilisierte Holzsplitter oder auf Filtrierpapier anzutrocknen.

Zu Infektionsversuchen eignen sich von kleinen Versuchstieren die Maus, das Meerschweinchen und Kaninchen. Die Impfung

[1]) *S. Kitasato*, Über den Tetanusbazillus. Zeitschr. f. Hyg. und Infektionskrankh. Bd. 7. S. 225 (1889).

[2]) *v. Lingelsheim*, Tetanus. *Kolle* und *Wassermanns* Handb. d. pathog. Mikroorganismen. Bd. 2. S. 567. Fischer, Jena (1903).

erfolgt subkutan. Auch bei der Verwendung von Reinkulturen ist immer von der aseptisch eröffneten Impfstelle die weitere Kultur anzulegen.

## Bacterium anthracis (*Koch*) Mig.

Der Erreger des menschlichen und tierischen Anthrax ist ein aërober Mikroorganismus, der dementsprechend am üppigsten unter freiem Zutritt des Luftsauerstoffes gedeiht, obgleich eine kümmerliche Vermehrung desselben auch unter vermindertem Sauerstoffzutritt zu beobachten ist. Die günstigste Temperatur für die Vermehrung und Sporenbildung liegt zwischen 30 und 40° C (35—37°). Bacterium anthracis läßt sich auf allen üblichen eiweißhaltigen Laboratoriumsnährböden kultivieren, sofern deren Reaktion neutral oder besser schwach alkalisch ist. Die Isolierung wird mittelst des Gelatineplattenverfahrens vorgenommen. Zur Verwendung kommt eine neutrale Nährgelatine. Als Ausgangsmaterial verwendet man bei Tierleichen das Blut oder die Gewebesäfte, besonders Milzsaft. Schon nach 2—3 Tagen zeigen sich auf der Platte die für den Anthraxerreger typischen Kolonien, die ein sehr lockeres Gefüge aufweisen. Vom dicken zentralen Teil der Kolonie gehen feine, gewundene und verschlungene Ausläufer ab. In der Umgebung findet eine langsame Verflüssigung der Leimgallerte statt. Etwas schwieriger ist die Gewinnung von Tierfellen, Hadern, Stroh oder Wasser u. dgl., da die genannten Objekte neben den geringen Mengen von Milzbrandsporen große Quantitäten anderer Bakterien beherbergen, die gewöhnlich bei der Zucht bei Zimmertemperatur, wie es das Gelatineverfahren erfordert, schneller und üppiger gedeihen, als die spärlichen Anthraxbakterien. In diesem Falle kann man nach dem Vorgang von *Gruber* [1]) verfahren und durch eine $^1/_4$—$^1/_2$stündige Erhitzung auf 60—70° C der wässerigen Aufschwemmung des Materials die vegetativen Bakterienformen vernichten und dann die Aufschwemmung einem empfänglichen Tier (Maus, Meerschweinchen) subkutan einspritzen. Selbstverständlich kann sie auch zum Plattenguß verwendet werden. Um den Tierversuch einwandfrei auch bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sporen des Erregers des malignen Ödems neben den Anthraxsporen ausführen zu können, hielt *Gruber* (l. c.) eine Aufschwemmung des zu untersuchenden Materials streng anaërob bei 37° C durch einige Zeit, worauf die Erhitzung auf 60—70° C erfolgte. Dabei werden die gekeimten Ödemsporen sicher ausgeschaltet. Die erhaltenen Reinkulturen werden auf Nähragar und Nährbouillon weitergezüchtet.

Für die Gewinnung reichlich Sporen enthaltenden Materials sei auf die von *Sobernheim* [2]) empfohlene Methode *Turrós* [3]) hingewiesen, nach welcher

[1]) *Gruber,* Österreich. Sanitätswesen. Bd. 8 (1896).

[2]) *G. Sobernheim,* Milzbrand. *Kolle* und *Wassermann,* Handbuch d. pathog. Mikroorg. Bd. **1**. S. 21 (1903).

[3]) *R. Turró,* Contribucion ad estudio de la esporulacion del bacillus anthracis. Gaceta medica catalana (1891). Ref. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. **10**. S. 91 (1891).

Aufschwemmungen des Milzbrandbakteriums auf Agarplatten ausgegossen werden.

Das gebräuchlichste von den empfänglichen Tieren ist die weiße Maus und das Meerschweinchen, welche subkutan geimpft werden. Für die Gewinnung eines Sporenvorrates, der sich trocken unter Luftabschluß jahrelang virulent und lebensfähig aufbewahren läßt, kann man aus einer sporenreichen Kultur Material auf ausgekochten Seidenfäden (ca. 2 *cm* lang) antrocknen. Diese werden in dickwandigen Proberöhrchen aufgehoben. Zur Neuzucht ist es am besten, einen Faden auf die schräge Fläche eines Agarröhrchens zu legen und im Brütschrank die Sporen keimen zu lassen. Von der erhaltenen Kultur impft man eine weiße Maus, aus deren Herzblut die neue Reinkultur gezüchtet wird.

## Bacterium avisepticum.

Der Erreger der Geflügelcholera oder Hühnerpest läßt sich auf allen üblichen Nährsubstraten bei Zimmer- und Brüttemperatur leicht züchten. Aus dem Vogelkadaver erlangt man durch Ausstreichen des steril entnommenen Herzblutes oder der ebenso gewonnenen Säfte der Organe (Milz, Lunge, Leber etc.) auf die schräg erstarrte Agarfläche meistens ohne weiteres Reinkulturen. Auf den von dieser Kultur angelegten Nährgelatineplatten zeigen sich in kurzer Zeit die kleinen, tröpfchenförmigen, durchscheinenden, feuchten Kolonien, die den Nährboden nicht peptonisieren.

Als Versuchstiere eignen sich besonders Hühner und Tauben, denen man miminale Mengen junger Kulturen in den Brustmuskel einspritzt. Bei der Sektion verimpft man steril entnommenes Blut aus dem Herzen.

Die Literatur findet sich bei *Th. Kitt* in *Kolle* und *Wassermanns* Handbuch.[1])

## Bacterium diphtheriae *(Loeffler)* Mig.

Für die Gewinnung und Züchtung der Diphtheriebakterien dienen in erster Linie folgende Nährsubstrate:

*a)* Der Blutserumnährboden nach *Beck.*[2]) In 100 $cm^3$ gewöhnlicher Nährbouillon werden 2 *g* reines Dextrin gelöst und dann 150 $cm^3$ Hammel- oder Rinderserum zugesetzt, in Röhrchen ausgefüllt und bei 70° C zum Erstarren gebracht. Dieser Nährboden unterdrückt oder hält zumindest das Wachstum der Mundbakterien zurück, besitzt also eine elektive Wirkung.

*b)* Agarblutserum nach *Escherich.*[3]) 2 Teile Nähragar mit 6% Glyzerin und 1% Dextrosegehalt werden mit einem Teil Rinderblutserum

[1]) *Th. Kitt,* Septikämie der Vögel (Hühnercholera). *Kolle* und *Wassermann*, Handbuch d. pathog. Mikroorg. Bd. 2. S. 543. Fischer, Jena (1903).

[2]) *M. Beck,* Bakteriologische Untersuchungen über die Ätiologie der menschlichen Diphtherie. Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskr. Bd. 8. S. 434 (1890).

[3]) *Th. Escherich,* Ätiologie und Pathogenese der epidemischen Diphtherie. I. Der Diphtheriebazillus. Wien (1894).

gemischt und nach dem Erstarren in der Eprouvette beimpft oder nach Einsaat der Bakterien zu Agarplatten verarbeitet.

*c)* Alkalischer Nähragar und ebensolche Nährbouillon. Neutralem Nähragar oder neutraler Nährbouillon werden nach *Boer* [1]) ungefähr 6—7 *cm*³ Normalnatronlauge pro Liter zugesetzt.

Die Gewinnung geschieht meist von einer Diphtheriemembran. Zu dem Ende wird ein wenig des diphtheritischen Belages mit steriler Watte oder keimfreier Federzange abgehoben und in ausgekochtem Wasser äußerlich von den anhaftenden Verunreinigungen befreit. Mit der gewaschenen Flocke infiziert man durch nicht besonders starkes Einreiben die Oberfläche von in Röhrchen schräg erstarrtem Dextrinblutserum. Man verimpfe immer 5—6 Proberöhrchen. Gleichzeitig kann man auf wenigstens 24 Stunden vorher gegossene Platten von alkalischem Agar, die kein Kondenswasser mehr auspressen, in gleicher Weise Ausstriche mit dem gewaschenen Membranstück machen. Diese Kulturen werden bei 35° C gehalten, entsprechend dem Temperaturoptimum zwischen 33 und 37° C.

Für die Tierpassagen eignen sich vor allem die Meerschweinchen, denen man entweder subkutan oder intraperitoneal ca. 1 *cm*³ 24stündiger Bouillonkultur einspritzt. Die Abimpfung nach dem Tode der Tiere geschieht im ersteren Falle von der aseptisch eröffneten Impfstelle, bei intraperitonealer Einverleibung aus dem Peritonealexsudat, da das Blut und die Organe oft, im ersten Falle in der Regel frei von Bakterien sind. Junge Hunde erweisen sich gegen Diphtherieinfektionen ebenfalls als sehr empfindlich.

Die Diphtheriebakterien in ihren Kulturen für längere Zeit virulent und lebensfähig zu erhalten, gelingt nach *Beck* [2]) dadurch, daß man sie auf dem Dextrinblutserumnährboden durch 3—4 Tage im Brutschrank züchtet, dann die Kulturröhrchen mit sterilisierten Gummikappen verschließt oder mit Paraffin vergießt und in einem Schranke in der Dunkelheit bei Zimmertemperatur aufbewahrt. So erhalten sie sich über 1 Jahr virulent und vermehrungsfähig. Auch in Bouillonkulturen sind sie in der angegebenen Weise leicht lange Zeit hindurch zu erhalten.

## Bacterium influenzae *(R. Pfeiffer), Lehmann* und *Neumann.*

Die Influenzabakterien finden sich reichlich im zähen, gelbgrünlichen Auswurf der Influenzakranken. Bevor man zur Züchtung schreitet, überzeuge man sich durch eine mikroskopische Untersuchung von der Anwesenheit derselben.

Zur Reinzüchtung verwendet man den *Pfeiffer*schen Blutagar. Man bestreicht die in Röhrchen schräg erstarrte Nähragarfläche mit

---

[1]) *O. Boer,* Über die Leistungsfähigkeit mehrerer chemischer Desinfektionsmittel bei einigen für den Menschen pathogenen Bakterien. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskr. Bd. **9**. S. 481 (1890).

[2]) *M. Beck,* Diphtherie. *Kolle* und *Wassermann,* Handbuch d. pathog. Mikroorg Bd. 2. S. 754. Fischer, Jena (1903). Hier auch eingehende Literatur.

frischem sterilen Blut des Menschen, der Taube, des Meerschweinchens oder Kaninchens. Auf die blutige Oberfläche werden Sputumflöckchen aufgestrichen, die man durch Ausschütteln von Influenzaauswurf in sterilisiertem Wasser erhält. Am zweckmäßigsten ist die Verwendung frisch aus der Ader austretenden Blutes der Taube (vgl. *Beck*[1]), das man aus einer Flügelvene gewinnt. Die Federn werden entfernt und die Haut gründlich desinfiziert. Überdies verwende man frisch gefüllte Röhrchen mit Nähragar, die noch Kondenswasser enthalten. Gezüchtet wird bei 37° C. Mit demselben Auswurf beschicke man noch ein Röhrchen mit gewöhnlichem Nähragar zur Kontrolle. Dieses soll steril bleiben oder höchstens Kolonien von Kokken aufweisen. Die Influenzabakterien entwickeln schon nach 16—24 Stunden kleine, dicht gedrängt stehende, wasserhelle, durchscheinende Kolonien, die dann mit der Platinnadel auf frischen Blutagar übertragen werden.

Für die Gewinnung großer Bakterienmengen bedient man sich der Taubenblutbouillon von *Delius* und *Kolle*[2]), die in folgender Weise bereitet wird: „50 $cm^3$ gewöhnlicher, deutlich alkalischer Nährbouillon wurden in Kolben mit möglichst breiten Boden gebracht, damit die Oberfläche der Flüssigkeitsschicht eine möglichst große war, um den sehr sauerstoffbegierigen Stäbchen den Verkehr mit der Luft möglichst zu erleichtern. Nach Sterilisierung der Kolben mit Inhalt wurden $^1/_4$—$^1/_2$ $cm^3$ defibriniertes Taubenblut zu jedem Kölbchen zugesetzt. Blut und Bouillon wurden dann gut darin geschüttelt und schnell zum Gefrieren gebracht. Beim Auftauen der Mischung, das nach einigen Stunden geschah, erhielten wir eine gleichmäßig von gelöstem Hämoglobin rot gefärbte Flüssigkeit." Besondere Sorgfalt ist bei der Gewinnung des defibrinierten Blutes notwendig, um es steril zu erhalten. Deshalb ist es empfehlenswert, mehrere solche Kolben herzustellen und zu beimpfen, um gewiß einige von fremden Bakterien sicher freie Kulturen zu erhalten. Die Infizierung dieser Nährböden geschieht mit Reinkulturen, die nach der oben angegebenen Weise erhalten wurden.

Sehr gutes Wachstum erzielt man nach *Delius* und *Kolle* auch auf Blutagar, also einem Gemisch von Nähragar und defibriniertem Blut. Man vermengt bei 45° C und läßt dann schräg erstarren.

Nach denselben Untersuchern erweisen sich Meerschweinchen für Tierpassagen dieser Bakterienart am zweckmäßigsten. Junge Blutagar- oder Blutbouillonkulturen werden dem Tier in größerer Menge intraperitoneal eingespritzt. Die neuen Kulturen sind aus dem Peritonealexsudat der eingegangenen Tiere zu gewinnen, denn nur in diesem findet nach den Untersuchungen von *Kolle* und *Delius* eine Vermehrung der eingebrachten Bakterien statt.

[1]) *L. Beck,* Influenza. *Kolle* und *Wassermann,* Handb. d. pathog. Mikroorg. Bd. 3. S. 357. Fischer, Jena (1903).

[2]) *M. Delius* und *W. Kolle,* Untersuchungen über Influenzaimmunität. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. 24. S. 329 (1897).

Zur Erhaltung virulenter und gut wachsender Kulturen des Influenzabakteriums ist es notwendig, sehr oft auf frischen Blutagar zu überimpfen. Man züchtet durch 2 Tage bei 37° C und gibt dann die gut angegangenen Kulturen in einen Thermostaten von 22° C, in dem keine weitere Vermehrung eintritt. Nach 5—6 Tagen sind jedenfalls frische Kulturen anzulegen, die wieder so behandelt werden.

### Bacterium mallei *(Loeffler)* Mig.

Rotzkulturen werden meist aus dem Naseneiter oder aus Geschwüren rotzkranker Tiere und Menschen gewonnen. Von der Leiche verwendet man als Ausgangsmaterial Rotzknoten der verschiedenen Organe, die man aseptisch entnimmt. Die Aussaat wird in Nährgelatine gemacht, die 4·5% Glyzerin enthält. Beim Wachstum findet eine allmähliche Erweichung des Nährsubstrates statt. Für die weitere Zucht eignet sich schwach saurer (nicht neutralisierter) Nähragar mit dem gleichen Glyzeringehalt. Außerdem sind immer Kartoffelkulturen anzulegen, die ein sehr charakteristisches Aussehen besitzen. Nach *Kresling* (vgl. *Wladimiroff* [1]) entspricht der optimale Säuregrad einer Kartoffelscheibe (von 1—1¼ *cm* Dicke) 0·1—0·3 $cm^3$ $^1/_{10}$-Normalnatronlauge. Dementsprechend sollen die Kartoffelscheiben vor der Sterilisation ausgewaschen und eine Stunde hindurch in eine 0·5—0·7%ige Lösung von doppelkohlensaurem Natron eingelegt werden, um dadurch die zu große Säuremenge auf das angegebene Maß zu bringen. Auf der Kartoffel bildet Bacterium mallei bei 37° C einen gleichmäßigen, schleimigen, honigartigen Überzug von gelbroter bis braunroter Farbe, der transparent ist.

Das Temperaturoptimum liegt bei 35—37° C.

In Kulturen geht die Virulenz bald zurück, obgleich sich die Bakterien lange Zeit hindurch lebensfähig erweisen. Besonders haltbar sind im Dunkeln bei niederer Temperatur aufbewahrte Glyzeringelatinekulturen, die nach gutem Auswachsen zugeschmolzen wurden. Auch nur mit Watte verschlossene Glyzerinbouillonkulturen sollen sich sehr gut halten. Soll die Kultur besonders virulent erhalten werden, ist natürlich eine öftere Überimpfung und Tierpassage notwendig.

Als Versuchstier eignet sich vor allem das Meerschweinchen, dem die Aufschwemmungen oder Rotzsekrete in die Bauchhöhle eingespritzt werden. Zu diagnostischen Zwecken verwendet man nur männliche Meerschweinchen wegen der bei der Rotzinfektion typischen Erkrankung der Hoden. Der Tod erfolgt nach 10—30 Tagen. Nach den Untersuchungen von *Kranzfeld* [2]) sind auch Ziesel (Spermophilus guttatus) sehr empfängliche Tiere, die schon nach 3—10 Tagen eingehen.

---

[1]) *A. Wladimiroff,* Rotz. *Kolle* und *Wassermann,* Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Bd. 2. S. 707. Fischer, Jena (1903).

[2]) *Kranzfeld,* Zur Kenntnis des Rotzbazillus. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. 2. S. 273 (1887).

## Pestbakterium.

Das Temperaturoptimum der Pesterreger liegt bei 30° C. Besonders gutes Wachstum erzielt man durch Verwendung von alkalischem Agar oder ebensolcher Gelatine. Nach der Vorschrift von *Petri* und *Maassen*[1]) wird der Nährboden zuerst durch Zufügen von Normalnatronlauge soweit neutralisiert, daß blaues Lackmuspapier nicht mehr gerötet wird. Dann gibt man auf den Liter noch $^1/_2$ *g* kristallisiertes Natriumkarbonat, wie aus den Angaben von *Kossel* und *Overbeck*[2]) hervorzugehen scheint. Mit diesem Nährsubstrat gießt man in dicker Schicht Platten in Petrischalen. Zur Oberflächenverimpfung durch Ausstreichen mit der Platinöse oder dem Platinpinsel verwendet man Material, welches die Pesterreger ohnehin schon meistens in Reinkultur enthält, also das Blut oder die Organsäfte an Pest verendeter Tiere. Die Platten werden bei 30° C gehalten. Schon nach 24 Stunden kann man die von den Pestbakterien stammenden tautropfenartigen Kolonien wahrnehmen und davon auf schräg erstarrte Agarröhrchen abimpfen. Sollen die Bakterien aus verunreinigtem Material gezüchtet werden, wie aus dem Sputum an Lungenpest leidender Menschen, dann ist die Verwendung von Gelatineplatten am Platze. Die Fleischwassergelatine wird mit dem gleichen Alkaleszenzgrad hergestellt. Damit werden Platten gegossen und nach dem Erstarren der Gelatine deren Oberfläche mit dem Sputum beimpft. Durch Klatschpräparate kann man sich von dem Angehen der Pestkolonien überzeugen, die ein überaus charakteristisches Aussehen besitzen und von den Verunreinigungen leicht unterschieden werden. Bezüglich der Morphologie derselben und der Bakterien sei auf die zusammenfassende Darstellung von *Dieudonné* im zweiten Bande des Handbuches von *Kolle* und *Wassermann* verwiesen.

Für die Züchtung in Flüssigkeiten verwende man alkalische Nährbouillon. Überhaupt bevorzugen die Pestbakterien nährstoffreiche und wasserreiche Nährsubstrate.

Für Tierversuche kommen in erster Linie Ratten und Meerschweinchen in Frage. Erstere impft man mit minimalen Mengen frischer Kultur subkutan. Meerschweinchen werden gewöhnlich durch Verreiben von jungen Kulturen auf der rasierten und gereinigten Bauchhaut infiziert. Die Abimpfung vom Tierkadaver geschieht durch Übertragen steril entnommenen Herzblutes in Nährbouillon oder auf Nähr-

---

[1]) *R. J. Petri* und *A. Maassen*, Über die Bereitung der Nährbouillon für bakteriologische Zwecke. Arb. a. d. kais. Gesundheitsamte. Bd. 8. S. 311 (1893).

[2]) *Kossel* und *Overbeck*, Bakteriologische Untersuchungen über Pest. Arb. a. d. kais. Gesundheitsamt. Bd. 18. S. 114 (1902). — Bei der Angabe des Alkaleszenzgrades von Agar auf S. 119 der genannten Arbeit ist die Nährbodenmenge, die durch 0·5 *g* $Na_2CO_3$ krist. alkalisiert werden soll, überhaupt nicht angeführt. Diese Ungenauigkeit wurde auch von *Dieudonné* in seine Bearbeitung der Pestbakterien im *Kolle* und *Wassermann*schen Handbuch einfach hinübergenommen. Es dürfte diese Sodamenge offenbar für ein Liter Substrat gemeint sein, weshalb oben auch die Angabe in diesem Sinne gemacht wurde.

agar. Bei der Weiterzüchtung auf künstlichen Nährsubstraten ist für eine oftmalige, mindestens wöchentlich einmalige Überimpfung Sorge zu tragen.

### Bacterium pneumoniae Mig. (Diplococcus pneumoniae).

Die Gewinnung desselben geschieht aus Auswurfsprodukten an Lungenentzündung Erkrankter. Da erfahrungsgemäß im vorhinein nie gesagt werden kann, ob die Bakterien leicht auf künstlichen Nährsubstraten wachsen werden oder nicht, so ist die Isolierung immer nach der Angabe *Weichselbaums*[1]) mit einem Gemisch von 1 Teil menschlichem Blutserum und 2 Teilen Nähragar zu versuchen. Zur Reinzüchtung kann man den unmittelbar vor dem Gebrauche bei 40° C gemischten Serumagar mit den Krankheitsprodukten versetzen, Verdünnungen anlegen und dann Platten gießen oder auf vorher gemachte Platten durch Ausstriche die Verdünnungen erzielen. Gezüchtet wird bei 37° C. Erheblich gefördert wird das Wachstum durch eine leicht alkalische Reaktion des Nährsubstrates und eine Zugabe von ca. 5% Glyzerin oder 2—3% Dextrose. Nach *Nissen* beträgt das Alkaleszenzoptimum 10—12 $cm^3$ Normalnatronlauge im Liter.

Bei leicht wachsenden Stämmen unseres Bakteriums kann die Isolierung auch durch leicht alkalische Nährgelatine erreicht werden. Dieselbe muß aber einen Gehalt von 15% Gelatine besitzen, damit eine Züchtung bei 24° C ohne Verflüssigung derselben ermöglicht ist. Bei dieser Temperatur findet eine langsame Vermehrung des B. pneumoniae statt.

Für die Erhaltung einer Laboratoriumskultur ist die sehr oftmalige Überimpfung auf dem erstgenannten Nährboden ein unbedingtes Erfordernis. Um sicher zu gehen, ist jeden 4. Tag eine Abimpfung vorzunehmen.

Für diese Bakterienart sind besonders empfänglich das Kaninchen und die Maus. Diese Tiere verenden nach einer größeren Dosis innerhalb von 3 Tagen bei subkutaner Infektion. Abgeimpft wird auf den zuerst genannten Nährboden vom Herzblut des gefallenen Tieres.

### Bacterium suicidum (Bacillus suisepticus).

In den an Schweineseuche erkrankten Tieren findet sich der Erreger dieser Erkrankung vornehmlich in der Lunge und in den bronchialen Lymphdrüsen, im übrigen aber sozusagen in allen Organen und im Blut.

Zur Reingewinnung verwende man die Gelatineplatte. Die Nährgelatine soll eine schwach alkalische Reaktion aufweisen, was übrigens auch für die übrigen Nährsubstrate gilt. Unsere Bakterienart wächst auf allen üblichen Nährböden. Das Temperaturoptimum liegt bei 37° C.

Sehr empfindlich für die Infektion erweisen sich die weißen und grauen Mäuse, Kaninchen und Meerschweinchen. Mäuse werden

---

[1]) *A. Weichselbaum,* Diplococcus pneumoniae und andere bei entzündlichen Lungenaffektionen gefundene Bakterien. *Kolle* und *Wassermann,* Handbuch d. pathog. Mikroorganismen. Bd. 3. S. 187. Fischer, Jena (1903).

am besten subkutan geimpft. Sie gehen meist innerhalb 24—48 Stunden ein. Die Abimpfung erfolgt vom Herzblut. Kaninchen und Meerschweinchen impft man entweder intraperitoneal oder subkutan. Auch hier gewinnt man die Kulturen wieder durch Anlegung von Blut- oder Milzausstrichen auf frischem, schräg erstarrtem Nähragar.

Da sich die Bakterien der Schweineseuche gegen Austrocknung empfindlich erweisen, sind öftere Überimpfungen zur Erhaltung vermehrungsfähiger Kulturen notwendig.

Im übrigen sei auf die erschöpfende Darstellung von *Joest*[1]) verwiesen.

### Bacterium tuberculosis *(Koch)* Mig.

Die Gewinnung und Isolierung geschieht entweder aus dem Sputum Tuberkulöser oder aus steril entnommenen tuberkulösen Organstücken. Für ersteres Verfahren kann nach *Koch* eine mechanische Reinigung der Linsen des Sputums in sterilem Wasser vorgenommen werden oder die von *Hesse*[2]) angegebene Methode benutzt werden. Beim *Koch*schen Verfahren wird das Sputum mindestens 10mal in sterilisiertem Wasser unter ständigem Wasserwechsel gewaschen und von den aus den Luftwegen und der Mundhöhle stammenden anderen Bakterien befreit, dann ein Stück einer Flocke mikroskopisch auf das Vorhandensein der Tuberkulosebakterien in Reinkultur geprüft. Von demselben Flöckchen wird nun ein Stückchen aus der Mitte entnommen und auf eines der unten beschriebenen Nährsubstrate gebracht. Bei der *Hesse*schen Methode bedarf es dieser Reinigung nicht. *Hesse* gibt folgenden Nährboden an:

| | |
|---|---|
| Nährstoff „Heyden" | 5·0 *g* |
| Kochsalz | 5·0 *g* |
| Glyzerin | 30·0 *g* |
| Agar-Agar | 10·0 *g* |
| Normallösung von Kristallsoda (28·6:100) | 5 *cm*³ |
| Destilliertes Wasser | 1000 *cm*³ |

Die Lösung des Nährstoffes „Heyden" geschieht in einem Becherglas, in das wenig Wasser geschüttet wird. Nun wird der Nährstoff „Heyden" hineingegeben und durch Schwenken des Glases benetzt, hierauf so lange gequirlt, bis derselbe vollständig gelöst ist. Diese Lösung wird dem bereits samt den übrigen Beigaben gelösten Agar zugesetzt. Dann wird das Nährsubstrat, in Portionen verteilt, durch angefeuchtete Filter im Dampfstrom filtriert.

*Hesse* gießt nun je 20 *cm*³ des angegebenen Nährsubstrates in *Petri*sche Schalen von ca. 9·5 *cm*³ Durchmesser aus und läßt Erstarren. Da-

[1]) *Joest*, Schweineseuche. *Kolle* und *Wassermann*, Handbuch d. pathog. Mikroorganismen. Bd. 3. S. 581. Fischer, Jena (1903).

[2]) *W. Hesse*, Ein neues Verfahren zur Züchtung des Tuberkelbazillus. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. Bd. 31. S. 502 (1899).

nach wird die Doppelschale umgekehrt und verbleibt in dieser Lage. Nunmehr wird eine Flocke des Sputums am Schalenrande auf den Nährboden gebracht und in einem geschlossenen Kreis herumgeführt und von diesem Streifen weiter auf der Platte verteilt, so daß 20—30 kleine, gesonderte Schleimflöckchen sich am Nährboden befinden. Durch von Zeit zu Zeit angelegte Klatschpräparate überzeugt man sich vom Wachstum der Tuberkelbakterien. Man benutzt dazu in der Flamme vor dem Gebrauche geglühte Deckgläschen, die auf die Mündung einer Proberöhre gelegt gegen den Nährboden von unten angedrückt und mit einer Platinöse abgehebelt werden. Bei längerer Züchtung umgibt man die Ränder der Doppelschale mit einem dünnen Kautschukstreifen zur Vermeidung der Austrocknung. Gezüchtet wird bei 37° C.

Findet eine Verimpfung von Gewebestücken statt, so werden dieselben zwischen sterilen Glasplatten zerquetscht und das Material mit einem Platinspatel auf die Oberfläche des Nährsubstrates verrieben.

Sehr kräftig gedeiht das Tuberkulosebakterium auch auf Nähragar mit einem Zusatz von 3—5% Glyzerin (1000 *cm*³ Fleischwasser aus Rind- oder Kalbfleisch, 10 *g* Pepton, 5 *g* Chlornatrium, 40 *g* Glyzerin, 12 bis 15 *g* Agar).

Für die Gewinnung größerer Mengen von Bakterienmaterial eignet sich die Zucht in Glyzerinbouillon, die entsprechend der Vorschrift für Glyzerinagar hergestellt wird.

Die Reinzüchtung kann auch mit Hilfe des Tierkörpers vorgenommen werden, indem man einem Meerschweinchen gewaschene Sputumflocken in eine Hauttasche einnäht. Nach dem Verenden des Tieres wird von Organstückchen auf einen der eben genannten Nährböden abgeimpft.

Die Überimpfung auf einen frischen Nährboden soll alle 4 Wochen vorgenommen werden.

## Microspira comma *(Koch)* Schrötter.

Die Reinzüchtung dieser Mikrobenart geschieht entweder aus den Reiswasserstühlen an Cholera asiatica Erkrankter oder aus der Choleraleiche. Immer überzeuge man sich gleichzeitig durch direkte mikroskopische Untersuchung von der Anwesenheit der Vibrionen in größerer Anzahl. Sind viele vorhanden, so gelingt die Isolierung ohneweiters durch die Gelatineplattenmethode. Hierzu verwendet man eine alkalische Gelatine. Als Alkaleszenzoptimum ergibt sich ein Zusatz von 30 *cm*³ 10%iger Natronlauge zum Liter Nährboden, ausgehend vom neutralen Substrat unter Anwendung von Lackmus als Indikator. Die Platten werden bei 22°C gehalten und schon nach 12 Stunden mikroskopiert und kurz darauf abgeimpft, um den mitverimpften Verunreinigungen möglichst auszuweichen. Nach dieser Zeit sind die Kolonien kaum makroskopisch sichtbar, gut aber unter dem Mikroskop. Es sind kleine, stark lichtbrechende Auflagerungen von grobkörnigem Gefüge, deren Oberfläche nach dem Ausdrucke *Robert Kochs* wie mit „Glasscherben“ bestreut erscheint. Dieses Merkmal kommt

besonders nach 24stündigem Wachstum zum Ausdruck, in welchem Stadium die die Kolonie umgebende Verflüssigungszone ebenfalls schon auffallend ist. Die Abimpfung geschieht auf schräg erstarrten, ebenso alkalisch gemachten Agarnährboden, der dann bei 37° C gehalten wird. Die ergiebigste Fundstelle in der Leiche ist der Darmabschnitt unmittelbar oberhalb der Ileozökalklappe, aus dessen Inhalt die Platten in größerer Anzahl zu gießen sind.

Um aus Substraten, die nur verhältnismäßig wenige Kommabazillen und sehr viele andere Bakterienarten enthalten, erstere zu isolieren, bedient man sich des sogenannten „Anreicherungsverfahrens", das sich auf die Erfahrung stützt, daß sich in Peptonlösungen an der Oberfläche die Choleravibrionen sehr rasch vermehren. Allerdings findet dabei auch eine rasche Vermehrung der übrigen Wasservibrionen statt, sofern es sich um eine Züchtung aus Wasser handelt. Hier kann nur die Anwendung aller Züchtungsverfahren einschließlich der hier nicht näher ausgeführten Agglutinationsprobe eine sichere Diagnose ergeben. Bei Fäzes als Ausgangsmaterial führt die Anreicherungsmethode sicherer zum Ziele. Für letzteren Zweck bereitet man eine Lösung[1]) von 10 *g* Peptonum siccum Witte, 10 *g* Kochsalz, 0·1 *g* Kaliumnitrat und 0·2 *g* kristallisiertem kohlensauren Natron in 1000 *cm*³ destilliertem Wasser. Dieses Nährsubstrat wird in Proberöhrchen in Portionen von 10 *cm*³ und in Erlenmeyerkölbchen in Portionen von 50 *cm*³ ausgefüllt und sterilisiert. Beim Gebrauch werden die Röhrchen mit wenigen Ösen voll Choleradejekt oder Dünndarminhalt beschickt, die Kolben mit ca. 1 *cm*³ dieser Substanzen. Bei 37° C entwickeln sich die Choleramikroben als zusammenhängende Haut an der Oberfläche der Nährflüssigkeit schon nach 6—10 Stunden. Man überzeugt sich durch mikroskopische Kontrolle davon. Von den Häuten der Röhrchen oder Kolben, in welchen die Haut anscheinend aus den gesuchten Mikroorganismen in Reinkultur besteht, gießt man in der oben angegebenen Weise Platten, deren Kolonien auf alkalischen Agar überimpft werden.

Zur Erhaltung der Virulenz und anderen biologischen Eigenschaften empfiehlt sich eine wöchentlich mindestens einmalige Überimpfung und monatliche Tierpassage. Man impft Meerschweinchen intraperitoneal mit einer größeren Dosis junger Bouillonkultur oder besser mit einer Aufschwemmung von 18—24stündiger Agarkultur in physiologischer Kochsalzlösung. Vom eingegangenen Tier legt man zuerst Herzblutkulturen an und dann verimpft man einige Ösen des stark vermehrten Peritonealsaftes auf Agarröhrchen.

## Actinomyces hominis.

Für die Gewinnung dieses Aktinomyzespilzes dient in erster Linie das durch Aspiration mit sterilen Pipetten bei der Operation vom Kranken

---

[1]) *W. Kolle*, Cholera asiatica. *Kolle* und *Wassermann*, Handbuch der pathog. Mikroorg. Bd. 3. S. 1. Fischer, Jena (1903).

gewonnene Material. Nach *Silberschmidt*[1]) wird das in der oben angeführten Weise erhaltene Material in sterilen Doppelschalen deponiert und auf das Vorhandensein von Aktinomyzes möglichst in Reinkultur mikroskopisch geprüft. Bei positivem Ausfall wird je eine Druse in Nährbouillon mit 1% Traubenzuckergehalt und Beigabe von 10 Tropfen 1%iger Schwefelnatriumlösung pro Röhrchen eingebracht. Man beschicke so etwa 10 Eprouvetten. Außerdem empfiehlt sich die Verwendung von Nähragar mit 1% Dextrosezusatz. Man legt aërobe Kulturen und mit Agar überschichtete Schüttelkulturen an, indem man in den flüssigen Agar verimpft, durchschüttelt und nach dem Erstarren Agar aufschichtet.

Ist der Aktinomyzeseiter durch Bakterien verunreinigt, wird in flüssigen Agarnährboden verimpft, rasch durchgeschüttelt und in weitere flüssige Agarsubstrate verimpft, um die üblichen Verdünnungen zu erhalten, die in Petrischalen ausgegossen werden. Das Durchsuchen nach Aktinomyzeskolonien muß sorgfältig ausgeführt werden. Gezüchtet wird bei Brüttemperatur (33—37° C).

Über die verschiedenen Aktinomyzesstämme, die sich nicht unwesentlich unterscheiden und von Aktinomyzeserkrankungen stammen, sowie über die Diagnose derselben sei auf die Zusammenstellung von *M. Schlegel*[2]) verwiesen.

Zu beachten ist, daß sich Actinomyces hominis in der künstlichen Reinkultur nicht lange lebensfähig erhält, weshalb die Kulturen desselben allmonatlich wenigstens einmal zu überimpfen sind. Wachstum unter Verflüssigung findet auch in Gelatinenährsubstraten statt, aber viel geringer als auf den genannten Nährböden.

## IX. Gewinnung und Züchtung verschiedener, nicht pathogener Mikroorganismen

### Eiweißspaltende Bakterien.

Solche Bakterienarten verschafft man sich dadurch, daß man rohes oder gekochtes Fleisch, Weizenkleber, Hühnereiweiß (gekocht oder roh) oder endlich Fibrinflocken in Wasser einbringt und eine geringe Menge Pepton und Traubenzucker zusetzt. Solche Infuse gibt man in Pulvergläser und beimpft die Proben mit etwas Jauche oder Sumpfwasser. Nach 24—48stündigem Aufenthalt dieser Substrate im Thermostaten mit 32° C legt man davon Gelatineplatten an und isoliert kräftig Gelatine verflüssigende Bakterienarten. Sehr energisch Eiweiß zerlegende Bakterienarten bekommt man auch dadurch, daß man ein Stück Fleisch in eine weite Schale bringt und nur bis etwa $^2/_3$ der Höhe des Fleischbrockens Leitungswasser

[1]) *W. Silberschmidt,* Über Aktinomykose. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., Bd. 37. S. 345 (1901).

[2]) *M. Schlegel,* Aktinomykose. *Kolle* und *Wassermann,* Handbuch der pathog. Mikroorg. Bd. 2. S. 861. Fischer, Jena (1903).

eingießt. Es siedeln sich zahlreiche Fäulniserreger auf dem feucht gehaltenen Fleisch an, dessen oberflächliche Partien schon nach 24—36 Stunden bei 32° C in eine weiche, schmierige, stinkende Masse übergeführt werden. Davon legt man Gelatineplatten an und impft wieder von kräftig peptonisierenden Kolonien ab.

An Stelle der genannten Substrate kann mit bestem Erfolge auch spontan in Fäulnis übergegangener Blutkuchen oder solches Blutserum verwendet werden.

## Harnstoff-Bakterien.

Die Erreger der Harnstoffgärung finden sich in jedem Dünger, in Jauche, im Flußwasser, Straßenkot usw. Nach den Untersuchungen von *Miquel*[1]) gelingt deren Reinzüchtung sehr leicht mit dem Gelatineplattenverfahren, wenn man eine leicht alkalische Peptongelatine verwendet, die 2—5% Harnstoff enthält. Als Ausgangsmaterial verwendet man am besten Dünger. Oft schon nach 24 Stunden, längstens nach einigen Tagen, bemerkt man Kolonien, die von einem schmalen, getrübten Hof umgeben sind. Diese Trübung ist auf hantelförmige Kristalle zurückzuführen, die aus Karbonaten und Phosphaten des Kalkes bestehen und durch das bei der Harnstoffzersetzung frei gewordene Ammoniak ausgefällt worden sind. Kolonien, an denen sich die genannten Erscheinungen zeigen, sind sicher solche von harnstoffvergärenden Bakterienarten. Man impft sie dann auf eines der unten genannten flüssigen Nährsubstrate. Als solches kann verwendet werden die leicht alkalische Nährbouillon mit einem Zusatz von 1—2 *g* Harnstoff im Liter. Auch Peptonwasser mit einem Gehalt von 0·1—0·2% Harnstoff eignet sich für die weitere Zucht ausgezeichnet.

## Nitrifikations-Bakterien.

Bei der Züchtung nitrifizierender Mikroben verfährt man nach den Untersuchungen von *Winogradsky*.[2]) Die auf S. 1225 angegebene Nährlösung *b* oder *c* wird in einen geräumigen Erlenmeyerkolben in 1 *cm* dicker Schicht eingefüllt und mit ca. 1 *g* Erde beschickt. Nach ungefähr 4—5 Tagen bei 22° C bemerkt man die ersten Anzeichen der Nitrifikation. Nach dieser Zeit kontrolliert man den Nitrifikationsvorgang durch den Nachweis von salpetriger Säure. Derselbe wird in der unten angegebenen Weise mit dem *Trommsdorf*schen Reagens ausgeführt. Außerdem untersucht man auf Nitrate und auf Ammoniak. Erstere weist man mit Diphenylamin-Schwefelsäure nach, letzteres mit dem *Nessler*schen Reagens. Die Reaktionen werden in der Weise ausgeführt, daß man vom Reagens ca. 1 $cm^3$ in kleine Porzellanschälchen bringt und nun mit dem Glasstab oder einer Platinöse einige Tropfen der Kultur entnimmt und zufließen läßt.

---

[1]) *P. Miquel*, Die Vergärung des Harnstoffes, der Harnsäure und der Hippursäure. *Lafars* Handb. d. techn. Mykologie. Bd. 3. S. 71. Fischer, Jena (1904).

[2]) *S. Winogradsky*, Die Nitrifikation. Ebendort. Bd. 3. S. 132 (1904).

Das *Trommsdorf*sche Reagens wird hergestellt durch Eintragen von 4 *g* in wenig Wasser verriebener Stärke in 100 $cm^3$ siedender, 20%iger Zinkchloridlösung in destilliertem Wasser. Man siedet unter Ersatz des verdampfenden Wassers bis zur fast vollständigen Klärung des Kleisters. Dann wird mit Wasser verdünnt, 2 *g* Zinkjodid zugesetzt und auf 1000 $cm^3$ aufgefüllt. Hierauf wird filtriert.

Das *Nessler*sche Reagens bereitet man folgendermaßen: 25 *g* Kaliumjodid werden in 25 $cm^3$ heißem, destilliertem Wasser gelöst und mit einer gesättigten, wässerigen Quecksilberchloridlösung versetzt, bis der sich bildende rote Niederschlag bleibend wird. Dazu sind ungefähr 10—12 $cm^3$ Sublimatlösung notwendig. Hierauf filtriert man vom Niederschlag ab und mischt das Filtrat mit einer Auflösung von 75 *g* Kalihydrat in 150 $cm^3$ Wasser und füllt in einem Meßkolben auf 500 $cm^3$ mit Wasser auf. Nunmehr setzt man noch 2 $cm^3$ der Quecksilberchloridlösung zu und dekantiert nach dem Absetzen des entstandenen Niederschlages. Das Reagens ist in sehr gut schließenden, kleinen Flaschen aufzubewahren. Der nach einiger Zeit entstehende Niederschlag schädigt die Wirkung des Reagens nicht.

Mit der Kontrolle beginnt man am vierten Tag. Zuerst wird auf Nitrite geprüft. Man bringt in einem Porzellanschälchen 1 $cm^3$ des *Trommsdorf*schen Reagens mit ein paar Tröpfchen verdünnter Schwefelsäure zusammen und entnimmt der Kultur mit der ausgeglühten Platinöse einige Tropfen, die man ebenfalls zufließen läßt. Tritt Blaufärbung ein, so beweist dies die Anwesenheit von salpetriger Säure bzw. Nitriten. Sobald die Reaktion auf Nitrite sich sehr intensiv zeigt, prüft man auf Ammoniak. Man bringt in ein weißes Schälchen einige Kubikzentimeter *Nessler*sches Reagens und läßt 1 Öse voll Kulturflüssigkeit zufließen. Auftretende Gelbfärbung zeigt Ammoniak an. Fällt die Probe mit dem *Trommsdorf*schen Reagens negativ aus, untersucht man auf Nitrate mit Diphenylamin-Schwefelsäure, indem man in ca. 1 $cm^3$ konzentrierter Schwefelsäure ein Kriställchen von Diphenylamin auflöst und wieder mit der Öse einige Tropfen Kulturflüssigkeit zufügt. Eintretende Blaufärbung beweist bei gleichzeitigem negativen Ausfall der Prüfung mit dem *Trommsdorf*schen Reagens die Anwesenheit von Nitraten.

Man beimpft nunmehr mit einer sterilen Pipette vom Bodensatz dieser Kultur eine frische Nährlösung (*b* oder *c*), läßt wieder den Nitrifikationsprozeß ordentlich in Gang kommen und wiederholt einige Male diese Umimpfungen. Für die sichere Gewinnung des Nitrit- oder Nitratbildners ist nur der richtige Zeitpunkt des Plattengusses von der größten Bedeutung. Soll ersterer isoliert werden, ist es zweckmäßig, in den Anreicherungskulturen stets Ammonsulfat zu haben, um den Oxydationsprozeß nur bis zur Bildung salpetriger Säure zuzulassen. Deshalb überzeuge man sich durch die Prüfung mit *Nessler*schem Reagenz täglich von der Anwesenheit des Ammonsalzes. Nimmt es schon sehr ab, dann fügt man sofort frische, sterile Ammonsulfatlösung zu. So gelangen vornehmlich die Nitritbildner zur Vermehrung, die dann verhältnismäßig leicht zu isolieren sind. Zur

Reinzüchtung derselben bereitet man die auf S. 1225 angegebene Kieselsäuregallerte, gießt mit dem Bodensatz der letzten Anreicherungskultur Platten und impft von diesen die Kolonien des Nitritbildners ab. Dies geschieht zu einer Zeit, in welcher ein ausgeschnittenes Stück der geimpften Gallerte intensive Nitritreaktion zeigt, was etwa am 8. bis 10. Tag einzutreten pflegt. Zu dieser Zeit haben die Kolonien des Nitritbildners eine dunkelbraune Farbe und runde Gestalt, wenn sie an der Oberfläche liegen. Die in der Tiefe des Nährbodens angegangenen Kolonien erscheinen unregelmäßig eckig.

Bei der Zucht der Nitratbildner geht man von älteren Anreicherungskulturen der oben beschriebenen Art aus, die zwar eine kräftige Nitratreaktion geben, aber nur eine möglichst geringe Nitrit- und Ammoniakreaktion aufweisen. Die Isolierung der Nitratbildner wird mit dem auf S. 1226 angegebenen Nitritagar durch Plattenguß ausgeführt.

### Denitrifizierende Bakterien.[1])

Denitrifizierende Bakterienarten finden sich in der Natur sehr weit verbreitet. Sie sind zahlreich vorhanden im Dünger, Grabenwasser, in der Gartenerde, im Meerwasser usf.

Nach *Iterson*[2]) verimpft man das Ausgangsmaterial in folgende Nährlösung:

| | |
|---|---|
| Calciumtartrat . . . . | 2 *g* |
| Kaliumnitrat . . . . . | 2 „ |
| Dikaliumphosphat . . . | 0·05 „ |
| Leitungswasser . . . . | 100 $cm^3$ |

Die Zucht in dieser Anreicherungskultur erfolgt streng anaërob, was dadurch erreicht wird, daß man den Kulturkolben bis oben mit der Nährflüssigkeit füllt und einen einfach durchbohrten Kautschukstoppel aufsetzt, der ein Gasableitungsrohr enthält, welches zum eventuellen Auffangen

[1]) *H. Jensen*, Verhältnis der denitrifizierenden Bakterien zu einigen Kohlenstoffverbindungen. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **3**. S. 622 (1897). — *Iterson*, Zersetzung von Zellulose durch aërobe Mikroorganismen. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **11**. S. 689 (1904). — *Jensen*, Denitrifikationsbakterien und Zucker. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **5**. S. 716 (1899). — *Giltay* et *Aberson*, Recherches sur un mode de dénitrification. Arch. néerland. scienc. natur. T. **25** (1899). — *Baur*, Über zwei denitrifizierende Bakterien aus der Ostsee. Wissensch. Meeresuntersuchungen. N. F. Bd. **6**. Abt. Kiel, S. 9. 1902. — *Lemmermann*, Kritische Studien über Denitrifikation. Jena 1900. — *Weissenberg*, Studien über Denitrifikation. Arch. f. Hyg. Bd. **30**. S. 274 (1897). — *Jensen*, Beitrag zur Morphologie und Biologie der Denitrifikationsbakterien. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **4**. S. 401 (1898). — *Maassen*, Die Zersetzung der Nitrate und der Nitrite durch die Bakterien. Arbeiten a. d. kais. Gesundheitsamt. Bd. **18**. S. 21 (1902). — *Burri* und *Stutzer*, Über nitratzerstörende Bakterien und den durch dieselben bedingten Stickstoffverlust. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **1**. S. 258 (1895). — *Künnemann*, Über denitrifizierende Mikroorganismen. Landwirtsch. Versuchsstat. Bd. **50**. S. 65 (1898).

[2]) *Iterson*, Anhäufungsversuche mit denitrifizierenden Bakterien. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **12**. S. 106 (1904).

der entstehenden Gase in ein mit Wasser gefülltes Eudiometerrohr mündet. Dieses steht auf der Brücke einer pneumatischen Wanne. Für diese Versuche eignet sich sehr gut auch die Zusammenstellung, die zur Zucht der Zellulosegärungsmikroben auf S. 1321 angegeben ist. Mit letzterer Einrichtung arbeitet man bei der genauen Untersuchung der entstehenden Gärungsgase. Die Anreicherungskulturen werden bei einer Temperatur von 28° C gehalten. Sobald eine kräftige Gasentwicklung einsetzt, impft man in einen zweiten Kolben ab, der die oben beschriebene Nährlösung enthält, und hält auch diese Zucht unter den gleichen Bedingungen. Durch einige derartige Anreicherungskulturen gelangt man meistens schon zu praktischen Reinkulturen von denitrifizierenden Mikroben. Vornehmlich handelt es sich um Bacillus nitrogenus Mig. Andere Denitrifikationsbakterien verlangen zu ihrer Anhäufung anders zusammengesetzte Kulturflüssigkeiten, betreffs der auf *Iterson* (l. c.) verwiesen sei.

Von dieser letzten Anreicherungskultur isoliert man die Denitrifikationsmikroben mit dem Gelatineplattenverfahren unter Verwendung der üblichen Nährgelatine mit einem Zusatz von 0·1% Kaliumnitrat.

## Schwefelbakterien. [1])

Schwefelbakterien finden sich überall dort, wo tierische und pflanzliche Überreste in stehenden oder nur wenig bewegten Wässern faulen. Dementsprechend sind dafür Fundstätten die Sümpfe und das Meer, vornehmlich in der Nähe der Küsten und in Buchten. Besondere Arten von Schwefelbakterien beherbergen Thermen und Schwefelquellen.

*Winogradsky* [2]) beschaffte sich auf folgende Weise ausgiebige Mengen von Schwefelbakterien: Einige Stücke der überall in Teichen vorkommenden Blumenbinse (Botumus umbellatus) samt dem anhängenden Schlamm werden in einen hohen Zylinder mit 3—5 *l* Wasser gegeben. Dann setzt man etwas Gips zu und läßt bei Zimmertemperatur unbedeckt stehen. Schon nach einigen Tagen wird Schwefelwasserstoff gebildet. Nach ungefähr 3—6 Wochen haben sich zahlreiche, besonders farblose Schwefelbakterien eingestellt.

*Nathanson* [3]) züchtete Schwefelbakterien aus dem Meere in einer 0·1- bis 1%igen Lösung von Natriumthiosulfat in Meerwasser und in einer Lösung folgender Zusammensetzung:

[1]) *S. Winogradsky*, Über Schwefelbakterien. Bot. Ztg. Bd. **45**. S. 493 (1887). — *H. Molisch*, Zwei neue Purpurbakterien mit Schwebekörperchen. Bot. Ztg. Bd. **64**. S. 223 (1906). — *E. Warming*, Om nogle ved Danmarks Kyster levende Bacterier. Kjöbenhavn 1876. — *A. Engler*, Über die Pilzvegetation des weißen oder toten Grundes in der Kieler Bucht. IV. Ber. d. Kommission z. wissensch. Unters. d. deutschen Meere. VII. bis IX. Jg. Berlin 1884.

[2]) *S. Winogradsky*, Beitrag zur Morphologie und Physiologie der Bakterien. H. 1 (1888).

[3]) *Nathanson*, Eine neue Gruppe von Schwefelbakterien. Mitteil. d. zool. Station Neapel. Bd. **15**. S. 655 (1902).

| | | |
|---|---|---|
| Natriumchlorid | . . . | 3·00 *g* |
| Magnesiumchlorid | . . | 0·25 „ |
| Kaliumnitrat | . . . . | 0·10 „ |
| Dinatriumphosphat | . . | 0·50 „ |
| Wasser | . . . . . . | 1000 *cm*³ |

Magnesiumkarbonatzusatz.

Nach *Beijerinck*[1]) gelingt die Massenzucht von Schwefelbakterien durch Einbringen von Grabenschlamm in eine Lösung von:

| | | |
|---|---|---|
| kristall. Natriumthiosulfat | . | 0·5 *g* |
| Natriumhydrokarbonat | . . | 0·1 „ |
| Ammoniumchlorid | . . . . | 0·01 „ |
| Magnesiumchlorid | . . . . | 0·01 „ |
| Dikaliumphosphat | . . . . | 0·02 „ |
| Wasser | . . . . . . . . | 100 *cm*³ |

### Purpurbakterien.

Für die Beschaffung der Purpurbakterien empfiehlt *Molisch*[2]), organische Substrate unter erschwertem Sauerstoffzutritt im Lichte in hohen Standzylindern (5—7 *cm* breit, 30—50 *cm* hoch) in Wasser faulen zu lassen.

Für die Süßwasserformen verwendet *Molisch* als Faulsubstrat Knochen, gekochte Eier, Regenwürmer, Schnecken, Blutegel, Fische, Frösche, pflanzliche Substrate, wie Heu, Früchte von der Wassernuß, Rhizome von verschiedenen Sumpfgewächsen u. dgl. Am besten geschieht die Zucht in der wärmeren Jahreszeit im direkten Sonnenlicht. Die Zeitdauer, in welcher Purpurbakterien reichlich auftreten, ist sehr verschieden und schwankt zwischen wenigen Wochen und 3—4 Monaten. In vielen Fällen, wo die Purpurbakterien nur schwierig angehen, ist das Aufgießen von Olivenöl zweckmäßig, um den Luftzutritt auf ein Minimum einzuschränken. Dasselbe wird in 1 *cm* dicker Schicht auf die Faulflüssigkeit gegossen.

Zur Beschaffung der marinen Purpurbakterien läßt man ausgeworfenes Seegras (Zostera) in hohen Standzylindern in Meerwasser am Lichte faulen. Viel rascher und besser ist die Entwicklung der Purpurbakterien, wenn man zum Seegras noch eine tote Krabbe oder einen Seeigel hinzugibt und das Infus mit Olivenöl bedeckt.

Über die für Weiterzüchtung und Reinzucht bestimmten Nährsubstrate vgl. S. 1226.

### Photogene Bakterien.[3])

Leuchtbakterien finden sich im Flußwasser und auch im Kote des Menschen. Sie können daraus mit schwach alkalischer Gelatine mittelst des

---

[1]) *M. W. Beijerinck,* Über die Bakterien, welche sich im Dunkeln mit Kohlensäure als Kohlenstoffquelle ernähren können. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 11. S. 593 (1904).

[2]) *H. Molisch,* Die Purpurbakterien. Fischer, Jena 1907.

[3]) Vgl. *H. Molisch,* Photogene Bakterien. *Lafars* Handb. d. techn. Mykologie. Bd. 1. S. 623. Fischer, Jena (1906).

Plattenverfahrens gewonnen werden. Weitaus die meisten photogenen Bakterien, die sich auf dem Fleisch der geschlachteten Tiere in Eiskellern ansiedeln oder auf toten Seefischen und im Meere vorkommen, bedürfen eines salzreichen Nährbodens zur künstlichen Zucht. Diese Arten gedeihen nur bei einem Kochsalzgehalt des Nährsubstrates von 3—3·5%.

Leuchtbakterien sind auf folgende Weise sehr leicht zu gewinnen: Größere Hautlappen eines frischen Seefisches mit einigen daran haftenden Fleischteilen werden in eine *Koch*sche Kulturschale gelegt und dann eine 3%ige Meersalzlösung darüber gegossen. Man gibt soviel Meersalzlösung in die Schale, daß Haut- und Fleischteile noch ungefähr 1 *cm* über die Flüssigkeitsoberfläche hervorragen. Dann bedeckt man lose mit dem Deckel. Diese Rohkultur hält man bei 8—12° C. Schon nach 20—30 Stunden sieht man leuchtende Punkte auf den hervorragenden Fleischteilen. Diese werden abgeimpft und mit den folgenden Gelatinenährböden zu Platten verarbeitet.

*Beijerinck*[1]) verwendet zur Reinzucht folgenden Nährboden: Es wird eine Seefischabkochung mit Meerwasser hergestellt. Zu dieser fügt man 8% Gelatine, 1/2% Asparagin, 1% Glyzerin und 1% Pepton. Die Reaktion dieser Nährgelatine soll leicht alkalisch sein. An Stelle der Gelatine kann man 1·5% Agar zusetzen und erhält so einen für Leuchtbakterien sehr brauchbaren Fischagar.

Verfasser züchtet die Leuchtbakterien auf einem Seefischagar, der aus einer Abkochung von 100 *g* Seefischfleisch mit 200 *cm*³ Leitungswasser bereitet wird, indem der filtrierten und aufs ursprüngliche Volumen ergänzten Suppe 2·5 *g* Pepton, 3 *g* Agar, 1 *g* Glyzerin und 6 *g* Kochsalz zugesetzt wird. Für die Isolierung der Leuchtbakterien verwendet Verfasser eine analog hergestellte Fischfleischgelatine mit 10% Gelatinegehalt.

Nach *Molisch* bereitet man einen für die Zucht der Leuchtbakterien sehr brauchbaren Nährboden auf folgende Weise: 125 *g* Pferde- oder Rindfleisch werden mit 1 *l* Wasser bei 10° C einen Tag hindurch digeriert. Der abgepreßte Fleischsaft wird mit 3% Kochsalz versetzt und durch Kochen von allen in der Hitze fällbaren Eiweißsubstanzen befreit. Hierauf filtriert man und fügt 10 *g* Pepton und 100 *g* Gelatine hinzu. Das Nährsubstrat wird bis zur schwach alkalischen Reaktion mit Natronlauge versetzt.

## Erreger der Methan- und Wasserstoffgärung der Zellulose.[2])

Nach *Omelianski* gewinnt man die Rohkulturen beider Bakterienarten in folgender Weise: In einen Kolben kommt am Boden in Streifen geschnittenes Filtrierpapier und auf dieses die auf S. 1226 angegebene Nähr-

[1]) *M. W. Beijerinck*, Over lichtvoedsel en plastisch voedsel van Lichtbacteriën. Verslag en mededeelingen d. koning. Akad. van Wetenschap., Afdeeling Natuurkunde. 2de Reeks. Deel VII. S. 239. Amsterdam (1890). Referat: Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. 8. S. 616 (1890).

[2]) *W. Omelianski*, Die Zellulosegärung. *Lafars* Handb. d. techn. Mykolog. Bd. 3. S. 253. Fischer, Jena (1904).

lösung, mit der der Kolben vollständig gefüllt wird. Dann setzt man Kreide zu und impft mit faulenden Blättern aus dem Grunde von Teichen oder Flußschlamm oder endlich frischem Pferdemist. Der Kautschukstopfen des Kulturkolbens ist durchbohrt und führt ein **S**-förmiges Ableitungsrohr, das in ein übergestülptes Gasauffanggefäß einmündet, welches in einer pneumatischen Wanne steht. Nebenstehende Fig. 407 zeigt uns die ganze Versuchsanordnung, wie sie Verfasser gewöhnlich benutzt. Die Kultur wird bei 34—35° C ausgeführt. Erst nach einer Woche zeigen sich die ersten Gärungserscheinungen. Die Flüssigkeit ist leicht getrübt und die Filtrierpapierstreifen erweichen, was daran sichtbar wird, daß sie sich eng zu-




Fig. 407.

sammenlegen und sozusagen „welken". Am Ende der Gärung bleibt ein halbverfaulter Filtrierpapierrest übrig, der bei der leisesten Berührung zerfällt und ein mißfarbiges Aussehen zeigt. Die Streifen sind angefressen und vielfach durchlocht. Von der weiteren Behandlung des Materiales hängt es ab, ob man zur reinen Methan- oder Wasserstoffgärung kommt.

Um die Wasserstoffgärung zu bekommen, erhitzt man vor der ersten Abimpfung auf einem weiteren Kolben das Aussaatmaterial durch 15 Minuten auf 75° C. Es werden nun noch einige Abimpfungen nach komplett durchgeführter Gärung gemacht. Vor jeder wird das Impfmaterial des letzten Kolbens die angegebene Zeit hindurch auf 75° C erhitzt. Auf diese Weise wird der Erreger der Methangärung aus-

geschaltet, da er sich vor dem Erreger der Wasserstoffgärung zu entwickeln pflegt und nach vollendeter Gärung fast vollständig verschwunden ist.

Zur Gewinnung der Erreger der Methangärung überimpft man während der Gärung (10—25 Tage nach der Einsaat) ohne vorhergehende Erwärmung in die gleiche Nährlösung mit Kreidezusatz wie oben, indem man ein Filtrierpapierstückchen, das angegriffen erscheint, überträgt. Solche Überimpfungen ohne eingeschaltete Erhitzung wiederholt man einige Male. Schon nach der 6. bis 7. Abimpfung hat man meistens eine reine Methangärung vor sich.

## Essigbakterien.[1])

Eine sehr ergiebige Fundstelle für Essigsäure bildende Bakterien sind die Holzspäne der Essigständer. Zur Anreicherungs- oder Vorzucht bringt man ein Stückchen eines Spanes in Bier oder Wein und hält die Probe bei 25° C. Man kann auch Hefewasser verwenden, dem 6—7% Alkohol zugesetzt sind. Als Kulturgefäß dient ein großer Erlenmeyerkolben, dessen Boden etwa in 1 *cm* hoher Schicht von der Nährflüssigkeit bedeckt ist. Zur Isolierung schreitet man, wenn dem Gefäß ein schwacher Geruch nach Essigsäure entströmt und bevor es zur Bildung einer sehr starken Zoogloëa kommt.

Für die Isolierung verwendet man Bier oder Weingelatine. Man fügt dem Biere oder Weine 10% Gelatine zu und sterilisiert dann in der üblichen Weise. Dabei verliert dieses Nährsubstrat Alkohol, weshalb man nach der Sterilisation 2—2½ $cm^3$ Äthylalkohol auf 100 $cm^3$ Nährboden hinzugibt. Auch mit Hefewasser hergestellte Nährgelatine erweist sich sehr brauchbar. Die weitere Zucht geschieht entweder in Würzegelatine oder -Agar mit 5—6% Alkoholgehalt.

Sind Späne aus Essigständern nicht erhältlich, kann man Essigbakterien einfach aus der Luft einfangen, wenn man Wein oder vergorene Fruchtsäfte in offenen Gefäßen an einem wärmeren Orte aufstellt. Nach einiger Zeit zeigt der Inhalt einen Geruch nach Essigsäure und es bilden sich an der Oberfläche dickere oder feinere Häute aus, je nach der Art der erhaltenen Essigbakterien. Die Reinzüchtung geschieht in der angegebenen Weise.

## Milchsäurebakterien.

Als Fundort für Milchsäurebakterien ist spontan sauer gewordene Milch und gärende Maische vornehmlich zu bezeichnen. Die Reinzüchtung geschieht entweder auf saurer aus Molken hergestellter Nährgelatine oder mit Hilfe des von *Beijerinck*[2]) angegebenen Kreide-

[1]) Vgl. *W. Henneberg*, Gärungsbakteriologisches Praktikum. Betriebsuntersuchungen und Pilzkunde. S. 510. Paul Parey, Berlin (1909). Hier sehr reiche Literatur und spezielle Verfahren für Schnell-, Wein- und Bieressigbakterien.

[2]) *W. M. Beijerinck*, Verfahren zum Nachweise der Säureabsonderung bei Mikrobien. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. **9**. S. 781 (1891).

nährbodens in Verbindung mit dem Zinkkarbonatnährboden. Letzteres Verfahren führt zu einer raschen Trennung der in Maische gleichzeitig vorhandenen Essigsäurebakterien. Zuerst stellt man sich einen Nährboden her, bestehend aus einer Hefewasser-Glukose-Gelatine (Agar), die mit geschlemmter Kreide versetzt ist. 8 *g* Hefe werden in 100 *cm*³ Wasser gekocht und mit 10 *g* Gelatine und 5 *g* Glukose versetzt. Nach dem Filtrieren wird eine Portion des Nährsubstrates mit Schlemmkreide bis zur starken milchigen Trübung versetzt, die andere mit Zinkkarbonat. Der Kreidenährboden wird zu Platten in Petrischalen verarbeitet. Ein Tropfen frischer gärender Maische wird nun in sterilem Wasser verteilt und damit die Kreidegelatineplatte übergossen. Das überschüssige Impfmaterial entfernt man durch Abgießen (siehe S. 1265). Es entwickeln sich die Kolonien der säurebildenden Bakterien, vornehmlich Essigsäure- und Milchbakterien, dann auch Hefen. Von den aus Bakterien gebildeten Kolonien impft man auf schräg erstarrte Hefewassergelatine ohne Kreide ab. Nun stellt man von der Zinkkarbonatgelatine Platten her und macht mit den angegangenen Reinkulturen Striche auf denselben. Die Essigsäurebakterien gedeihen gut und hellen rasch einen großen Hof um den Impfstrich auf, während die mit Milchsäurebakterien angelegten Impfstriche viel geringere Aufstellungszonen und schlechtes Wachstum zeigen.

## Buttersäurebakterien.

Nach *Beijerinck*[1]) verfährt man zur Gewinnung von Granulobacter saccharobutyricum auf folgende Weise: In ein Kochkölbchen gibt man eine 5%ige Auflösung von Glukose in destilliertem Wasser mit einem Gehalt von 5% fein gemahlenem Fibrin. Es wird kräftig gekocht, noch während des Kochens etwas feuchte Gartenerde eingebracht und sofort nach der Infektion noch heiß in den Thermostaten mit 35° C gebracht. Nach 24—48 Stunden ist die Gärung in vollem Gange. Von Zeit zu Zeit neutralisiert man mit Natronlauge. So erhält man eine Anhäufung dieser Bakterienart, die sich in dieser rohen Zucht in praktischer Reinkultur befindet. Mittelst der anaëroben Reinzuchtverfahren unter Verwendung von saccharosehaltiger Nährgelatine kann man dann leicht Reinkulturen erhalten.

Um ausgeprägte Klostridienformen zu erhalten, verwendet man als Kulturflüssigkeit eine Auflösung von 5 *g* Saccharose, 0·05 *g* Natriumphosphat, 0·05 *g* Magnesiumsulfat und 0·05 *g* Chlorkalium in 100 *cm*³ Wasser. Dieser Lösung setzt man 3 *g* präzipitiertes Calciumkarbonat und 5 *g* fein gemahlenes Fibrin zu. Hierauf wird gekocht und in der oben angegebenen Weise weiter verfahren.

Bezüglich der Einteilung und Diagnose der anaëroben Buttersäurebakterien sei auf die grundlegende Arbeit von *Schattenfroh* und *Graßberger*[2]) verwiesen.

---

[1]) *W. M. Beijerinck,* Über die Einrichtung einer normalen Buttersäuregärung. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 2. S. 699 (1896).

[2]) *A. Schattenfroh* und *R. Graßberger,* Über Buttersäuregärung. Archiv f. Hyg. Bd. 37. S. 54 (1900).

## Gewinnung von Spirillen.

In der Natur kommen große Spirillen sehr häufig vor, besonders in Schweinejauche, in Strohaufgüssen, im Grabenwasser und im Sumpfwasser. Zur Anreicherung für die künstliche Kultur stellt man folgende Nährlösung her[1]):

| | |
|---|---|
| Wasser . . . . . | 1000 *cm*³ |
| Calciumacetat . . . | 2 *g* |
| Dikaliumphosphat . . | 0·05 *g* |
| Pepton . . . . . | 0·05 *g* |

Diese Nährlösung wird im Erlenmeyerkolben von 100 *cm*³ in ziemlich hoher Schicht eingegossen und mit wenig Grabenschlamm oder Sumpfschlamm beschickt. Schon nach 48 Stunden bei 32° C zeigt sich ein feines, irisierendes Häutchen, das fast ausschließlich aus großen Spirillen besteht. Man impft nun weiter auf eine Reihe von Kölbchen mit der genannten Nährlösung. Nach 4—5 Rohkulturen schreitet man zur Reinzucht. Dazu benutzt man folgenden Spirillenagar (vgl. *Zettnow*[2]).

Agar wird in einer Menge von 8 *g* in Wasser durch 8 Tage faulen gelassen und weitere 8 Tage in fließendem Leitungswasser gewaschen. Verfasser gibt ihn in ein feinmaschiges Sieb, das in einer Glastasse steht. Von oben her wird ein konstanter Wasserstrom in das Sieb laufen gelassen. Man kocht fein gehacktes Pferdefleisch mit der gleichen Menge Wasser durch 1 Stunde auf offenem Feuer, läßt auskühlen, preßt ab und füllt das Filtrat auf das ursprüngliche Volumen wieder auf. Der Agar wird nun auf dem Sieb vom überschüssigen Wasser befreit und in eine Mischung von 125 *cm*³ obigen Fleischwassers, 125 *cm*³ Wassers und 0·5 *g* Pepton eingetragen und im Dampftopf zur Lösung gebracht.

Nun stellt man sich ein 1⁰/₀ige Lösung von Ammonsulfat, eine 1⁰/₀ige Lösung von Kaliumnitrat und eine 5⁰/₀ige Lösung von Calciumlaktat her. Man mischt 90 *cm*³ vom obigen Fleischwasserpeptonagar mit 18 *cm*³ der Kaliumnitratlösung, 18 *cm*³ der Ammonsulfatlösung und 54 *cm*³ der Calciumlaktatlösung und setzt soviel Natronlauge zu, bis Lackmus deutlich gebläut wird. Nach Abkühlung des Nährbodens auf 50° C werden 20 *cm*³ einer 5⁰/₀igen Eieralbuminlösung zugesetzt. Hierauf erhitzt man im Dampfschrank durch 40 Minuten und filtriert. Der in Röhrchen abgezogene Agarnährboden wird zu Platten verarbeitet, die mit einer Aufschwemmung der aus den Anreicherungskulturen gewonnenen Spirillen in sterilem Wasser übergossen werden. Der Überschuß der Bakterienemulsion wird sofort wieder abgeschüttet und der Schalenrand mit einem in Alkohol getränkten und gut ausgedrückten

[1]) *G. van Iterson*, The decomposition of cellulose by aerobic microorganisms. Kon. Akad. van Wettenskappen te Amsterdam. p. 685 (1903). Ref. *Kochs* Jahresber. 1903. S. 460.

[2]) *Zettnow*, Nährboden für Spirillum Undula majus. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. **19**. S. 393 (1896).

Wattebausch abgewischt. Die Kulturen werden bei 28° C gehalten und täglich auf Kolonien untersucht. Von den Spirillenkolonien werden auf schräg erstarrtem Spirillenagar obiger Zusammensetzung die Reinkulturen angelegt.

### Strahlenpilze.

Nach *Berestneff*[1]) gewinnt man Aktinomyzesarten sehr leicht auf folgende Weise:

In eine große, gläserne Doppelschale (am besten *Koch*sche Kulturschale) wird eine Lage von sterilisiertem Sand gegeben, den man mit sterilem Wasser befeuchtet. In diese Sandschichte werden nun trockene Grashalme (Heuteile), Ähren oder Strohhalme wie Setzlinge eingesteckt. Die bedeckten Schalen hält man bei 22—25° C. Nach einigen Tagen entstehen in dem Sand um die eingesteckten Halme weißliche, wie Kreideflecke aussehende Kolonien, die aus Strahlenpilzen bestehen.

### Schimmelpilze.

Für die Gewinnung bestimmter Schimmelpilze läßt sich kaum eine Vorschrift geben. Am besten ist es, angefeuchtetes Brot in einer offenen Schale einige Stunden der freien Luft auszusetzen und dann in den Thermostaten mit 22° C zu bringen. So fängt man gewöhnlich einige Arten von Schimmelpilzen ein.

Auch mit einer Gelatineplatte aus sauer reagierender Gelatine wird man ihrer leicht habhaft, wenn man sie unbedeckt für einige Stunden im Laboratorium aufstellt. Bei den angegangenen Schimmelkolonien wartet man die Bildung der Sporangien ab und geht bei der Reinzüchtung von der Spore aus. In einer mikroskopischen feuchten Kammer bringt man Sporen auf die Gelatine, wie es bei der Zucht aus einer Zelle beschrieben ist (S. 1234). In unserem Falle impfen wir die eben gekeimte Spore ab.

## X. Methoden der bakteriologischen Wasser-, Boden- und Luftuntersuchung.

### Wasseruntersuchung.

Als oberster Grundsatz bei jeglicher bakteriologischen Wasseruntersuchung hat zu gelten, jede entnommene Wasserprobe sofort oder innerhalb der nächsten Zeit zu verarbeiten. In letzterem Falle ist die Probe unmittelbar nach der Entnahme in Eis zu verpacken und darin bis zur Verarbeitung zu belassen. Alle Gefäße, mit denen die Probe in Berührung kommt, sind sorgfältig zu sterilisieren.

Die Entnahme einer Wasserprobe wird nun in verschiedener Weise und mit verschiedenen Gefäßen vorgenommen, je nachdem ein

[1]) *N. Berestneff,* L'Actinomycose et ses agents inféctieux. Moskau 1897.

Brunnen, eine Leitung oder ein offenes Gewässer zu untersuchen ist. Aus Leitungen ununterbrochen fließendes Wasser fängt man einfach in sterile Erlenmeyerkolben auf, die einen Watteverschluß tragen. Vor Auffangen der Probe reinigt man die Ausflußöffnung sorgfältig und faßt die Probe, nachdem einige Minuten der Wasserstrom weitergeflossen ist. Handelt es sich um abgesperrt gewesene Leitungen, so läßt man längere Zeit Wasser fließen und entnimmt erst dann die Probe. Daß Neuanlagen von Rohrleitungen für Brunnen vor der Entnahme der Wasserprobe sterilisiert werden müssen, braucht kaum besonders hervorgehoben werden. Dafür ist nach den Angaben von *Neisser*[1]) ein Dampfstrom zu verwenden.

Aus offenen Gewässern entnehme man die Probe entfernt vom Ufer in einer sterilisierten Flasche von 200—500 *cm*³ Inhalt. Dieselbe ist mit einem tadellos eingeschliffenen Stopfen versehen, wird in gewöhnliches Filtrierpapier eingeschlagen und dann bei 150° im Heißluftsterilisator sterilisiert (siehe S. 1205). Zur Entnahme ist es am besten, sich in einem Kahn weiter vom Ufer zu entfernen, die ausgewickelte verschlossene Flasche mit den Händen ca. 20 *cm* unter die Oberfläche zu halten und dann den Stopfen zu lüften. Wenn die Flasche etwa $^2/_3$ voll ist, verschließt man unter Wasser und hebt die Flasche heraus. Man stellt die Probe sofort im Dunkeln in Eis ein.

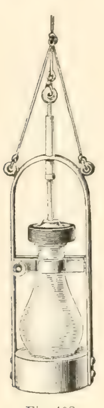


Fig. 408.

Von den zahlreichen Apparaten, die zur Entnahme von Wasserproben aus bestimmten Tiefen dienen, sei besonders erwähnt die Einrichtung nach *Esmarch.*[2]) Bei derselben wird einem Metallgestell, welches durch Bleiausgüsse beschwert ist, ein starkwandiger Erlenmeyerkolben eingefügt. Als Verschluß dient ein Bleizylinder, der an der der Glasmündung zugekehrten Seite eine mit Watte ausgepolsterte Kautschukkappe trägt. Dieser Stempel gleitet in Führungen und läßt sich mit einer angebrachten Schnur heben. Der ganze Apparat hängt an einer starken Schnur, die Metermarken trägt. In Fig. 408 ist derselbe in etwas abgeänderter Form wiedergegeben. Beim Gebrauch wird der Kautschukverschluß mit 60% Alkohol gut gereinigt, dann der Alkohol verdampfen gelassen und jetzt nach Entfernung des Wattebausches der passende, sterilisierte Erlenmeyerkolben eingesetzt. In beliebiger Tiefe kann durch Anziehen der Schnur der Verschluß gehoben werden, um Wasser in die Flasche eindringen zu lassen.

[1]) *Max Neisser,* Dampf-Desinfektion und -Sterilisation von Brunnen und Rohrlöchern. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. **20**. S. 301 (1895).

[2]) *A. Dräer,* Das Pregelwasser oberhalb, innerhalb und unterhalb Königsberg in bakteriologischer und chemischer Beziehung, sowie hinsichtlich seiner Brauchbarkeit als Leitungswasser, nebst einigen Bemerkungen über die Selbstreinigung der Flüsse und über die Einleitung von Abwässern in Flußläufe. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. **20**. S. 339 (1895).

Für das Abmessen der zu verimpfenden Wassermenge benutzt man Pipetten, die 1 *cm*³ (in Zehntel geteilt) fassen. Am zweckmäßigsten sind enge Röhrenpipetten, die eine 0-Marke und die Zehntelkubikzentimetermarken tragen. Man läßt dann bis zum Teilstrich, der die gewünschte Zehntelkubikzentimeteranzahl angibt, ablaufen. Auslaufpipetten sind nicht zu empfehlen. Man hält sich einen größeren Vorrat von sterilisierten Pipetten, die man mit der Spitze nach unten in eine größere Eprouvette stellt, welche mit einem Wattebausch verschlossen ist. Die chemisch gereinigten Pipetten werden mit Alkohol ausgespült, dann getrocknet, in die Eprouvette eingestellt und dann im Heißluftsterilisator keimfrei gemacht.

Die Plattenkulturen werden nach *Heim*[1]) am besten mit Fleischwasserpeptongelatine angelegt, da mit dem Abstiftungsverfahren nach *Hiltner* und *Störmer*[2]) die Gefahr des Überwucherns Gelatine verflüssigender Mikroben beseitigt wird.

Das „Abstiften" geschieht in der Weise, daß man diejenige Kolonie, die den Nährboden zu überwuchern droht, sofort mit einem Stängelchen von salpetersaurem Silber betupft oder damit umzieht. Über den Silberwall wächst sie dann nicht hinaus. Enthält der Nährboden Chloride, wie in unserem Falle, scheidet sich sofort Silberchlorid aus, das sich alsbald bräunt. Wenn man für die abzustiftende Bakterienart Interesse hat, muß man sie natürlich vor dem Abstiften abimpfen, da die Bakterien dabei vernichtet werden.

Das Instrumentarium für bakteriologische Wasseruntersuchungen besteht im wesentlichen aus folgenden Geräten: eine reichliche Anzahl sterilisierter Petrischalen, die vor dem Erhitzen im Heißluftsterilisator in Filtrierpapier eingeschlagen werden — man wähle solche Schalen aus, die einen ebenen Boden besitzen; eine größere Anzahl steriler Pipetten; eine entsprechende Anzahl von Proberöhrchen mit 5—10 *cm*³ Fleischwasserpeptongelatine; sterilisierte Flaschen zur Entnahme der Wasserproben, bei solchen aus bestimmten Tiefen einen entsprechenden Apparat; dann 6—10 Flaschen mit genau 27 und 49 *cm*³ sterilem Wasser, zur Anlegung der Verdünnungen bei sehr bakterienreichen Wasserproben; weiters eine Spirituslampe, eine Spiegelglasplatte oder Steinplatte zum Auflegen der Petrischalen beim Erstarren der Gelatine, eine Wasserwage zum Horizontalstellen der vorgenannten Platte, endlich einige Klebezettel, einen Glasschreibstift, eine Federzange und einen Eiskühler, wie ihn *Franz Král* in der Prager medizinischen Wochenschrift 1891 beschrieben hat. Unsere Abbildung Fig. 409 zeigt denselben. Außerdem gehört zur kompletten Ausrüstung ein Thermometer. Am besten ist es, mit den genannten Gerätschaften ausgerüstet, den Plattenguß an Ort und Stelle sofort nach der Entnahme auszuführen.

---

[1]) *L. Heim*, Lehrbuch der Bakteriologie. S. 481. Enke, Stuttgart (1906).

[2]) *L. Hiltner* und *K. Störmer*, Studien über die Bakterienflora des Ackerbodens, mit besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens nach einer Behandlung mit Schwefelkohlenstoff und nach Brache. Arb. a. d. biolog. Abt. f. Land- u. Forstwirtschaft am kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. 3. S. 445 (1903).

Die Art und Weise der Wasserentnahme wurde bei den Apparaten bereits beschrieben, weshalb im folgenden der Gang der Untersuchung vom Plattenguß ab kurz dargelegt ist.

Man verflüssigt zuerst am Spiritusbrenner in einem Wasserbad die voraussichtlich in Verwendung kommenden Gelatineröhrchen und stellt die Steinplatte mit der Wasserwage horizontal ein. Hierauf entnimmt man die Wasserprobe und bringt davon 1 $cm^3$ in eine Petrischale in der Weise, daß man diese in Tropfenform in der Schale verteilt. Dann gießt man den Inhalt eines verflüssigten, auf 33° C abgekühlten Gelatineröhrchens hinzu und mischt durch vorsichtiges wiederholtes Neigen der Schale das Wasser mit der Gelatine. Vor dem Eingießen ist der Rand des Proberöhrchens abzuflammen. Dann stellt man die Schale zum Erstarren auf die Steinplatte. Die von *B. Fischer* herrührende Methode des Mischens in der Schale ist weitaus genauer als die Einführung der abgemessenen Wasserprobe in das Proberöhrchen mit Gelatine und der nachherige Plattenguß.



Fig. 409.

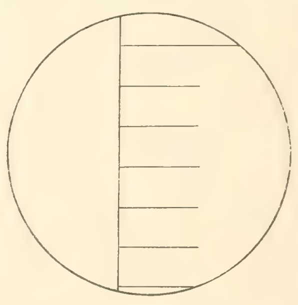


Fig. 410.

In der gleichen Weise legt man noch Platten mit 0·5 $cm^3$ Wasserprobe an. Dann verdünnt man die Wasserprobe, indem man 1 $cm^3$ derselben in das Fläschchen mit 49 bzw. 24 $cm^3$ sterilisiertem Wasser einbringt und sehr gut durchschüttelt. Davon gießt man wieder in der angegebenen Weise Platten unter Zusatz von 1 $cm^3$ der verdünnten Probe. Über diese Verdünnungen sind genaue Aufschreibungen zu führen, da dieselben zur Erreichung der wirklichen Keimzahl die Grundlage bilden. Sobald die Platten erstarrt sind, kommen sie in den Eiskühler.

Die Züchtung der Platten erfolgt bei 20—22° C und hat 7—10 Tage hindurch zu dauern. Die Platten sind täglich zu kontrollieren und stark verflüssigende Bakterienkolonien durch Abstiften auszuschalten.

Die angegangenen Kolonien werden nun gezählt. Die Zählung hat immer mikroskopisch zu geschehen, da nur dann zuverlässige Zahlen zu erhalten sind.

Sind nicht allzu viele Kolonien angegangen (1000—1500), so nimmt man die **Gesamtauszählung**[1]) der Platte nach *Heim*, modifiziert von *Schütz*, vor. Zu dem Ende zieht man auf der Unterseite der Schale eine Anzahl von parallelen Tuschelinien in Entfernungen, die entsprechend dem verwendeten Objektiv und Okular gewählt werden. Man verwendet dazu nur schwache Systeme mit höchstens 50facher Vergrößerung. Man bestimmt die Entfernung sehr leicht dadurch, daß man zuerst auf einen Milimetermaßstab scharf einstellt und nachsieht, wie viele Millimeter auf das Gesichtsfeld gehen. So weit entfernt zieht man die Linien. Fig. 410 zeigt uns das Gesichtsfeld, in dem ein Maßstab mit Millimeterteilung eingestellt ist. Wir übersehen 6 *mm*. Dementsprechend sind die Linien in einem Abstand von 6 *mm* auf der Rückseite der Schale zu ziehen. Man zählt nun die Kolonien in jedem Streifen von einer Seite beginnend. Jede beendete Reihe erhält ein Zeichen mit Tusche. Von denjenigen Kolonien, die gerade auf der Linie liegen, werden alle jene mitgezählt, welche von der oberen Linie durchschnitten werden. Um die tiefliegenden Kolonien nicht zu übersehen, zählt man bei enger Blende und unter ständigem Heben und Senken des Tubus.

Wie schon angedeutet, empfiehlt sich diese Art der Zählung dann, wenn verhältnismäßig weniger Kolonien angegangen sind. Sind viele vorhanden, so werden 30 **Gesichtsfelder gezählt** (*Neisser*[2]), die in ungefähr gleichen Abständen auf der Platte liegen. Man markiert dieselben auf der Rückseite der Platte mit Tuschepunkten, die in die Mitte des Gesichtsfeldes nach und nach eingestellt werden. Nach der Zählung eines Feldes wird der entsprechende Punkt durchstrichen oder gelöscht. Aus sämtlichen erhaltenen Zahlen wird das arithmetische Mittel gerechnet. Dann berechnet man, wie oft das Quadrat des Durchmessers des Gesichtsfeldes im Quadrat des Schalendurchmessers enthalten ist und multipliziert diese Zahl mit der mittleren Keimzahl eines Gesichtsfeldes. Den Durchmesser eines Gesichtsfeldes ermittelt man, indem man einen Objektmikrometer in die Mitte einstellt und die Teile abliest, die auf ein Gesichtsfeld gehen. Den Schalendurchmesser bestimmt man mit einem genauen Millimetermaßstab.

Befinden sich auf der Platte auch für diese Zählung zu viele Kolonien, so arbeitet man mit stärkerer Vergrößerung und zählt nur Teile von **Gesichtsfeldern**. Für diese Zwecke hat *Heim*[3]) eine **Okularzählscheibe** angegeben, die an Stelle eines Okularmikrometers in das Okular gelegt wird. Dieselbe besitzt eingeätzt eine Anzahl von konzentrischen Kreisen und Strichkreuzen, die sich im Mittelpunkt der Kreise schneiden. Entsprechend der Kolonienanzahl zählt man das Feld des kleinsten oder eines größeren Kreises aus, wobei die Strichkreuze durch Unterabteilung der Fläche die Zählung erleichtern. Wieder zählt man 30 Felder, die in

[1]) *L. Heim*, Lehrbuch der Bakteriologie. S. 484. Enke, Stuttgart (1906).

[2]) *M. Neisser*, Die mikroskopische Plattenzählung und ihre spezielle Anwendung auf die Zählung von Wasserplatten. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. 20. S. 119 (1895).

[3]) *L. Heim*, Lehrb. d. Bakteriol. S. 485. Enke, Stuttgart (1906).

ungefähr gleichen Abständen auf der Platte verteilt sind. Die Rechnung wird analog durchgeführt, nachdem man die Größe des Durchmessers vom Gesichtsfeldteil und von der Schale gemessen hat, nach der Formel

$$Z = \frac{D^2}{d^2} \cdot a,$$

in der Z die Keimzahl der Platte, D den Schalendurchmesser in Millimetern, d den Durchmesser des gezählten Gesichtsfeldteiles und a das arithmetische Mittel der für jeden gleichgroßen Gesichtsfeldteil erhaltenen Zahlen der Kolonien bedeutet.

Aus der erhaltenen Kolonienzahl der Platte berechnet man die Anzahl der Bakterien für den Kubikzentimeter der Wasserprobe, was natürlich bei Verwendung eines Kubikzentimeters zum Plattenguß wegfällt. Würde eine 25- oder 50fache oder noch stärkere Verdünnung vorgenommen, dann ist die für den Kubikzentimeter des in die Platte verimpften Substrates berechnete Keimzahl noch mit der Größe der Verdünnung zu multiplizieren, um die wahre Keimzahl für den Kubikzentimeter ursprünglicher Wasserprobe zu erhalten.

Die Platten werden am siebenten bis zehnten Tag ausgezählt. Sind Artbestimmungen von angegangenen Kolonien zu machen, wird man vor der Zählung von den in Frage kommenden Kolonien die Abimpfungen vornehmen. Ist dies nicht der Fall und können aus Zeitmangel oder irgend einem Umstand die Platten nicht zur richtigen Zeit ausgezählt werden, kann man sie für diesen Zweck mit Formalin konservieren. Zu dem Ende werden sie entweder nach Abnahme des Deckels in einen größeren gutschließenden Behälter gegeben, auf dessen Boden ein in Formalin getränkter Wattebausch liegt, oder man desinfiziert sie nach *Heim*.[1]) Danach nimmt man eine ca. 1 *cm* größere Filtrierpapierscheibe als der Deckel groß ist, legt sie auf die offene Schale und preßt den Deckel darauf. Dann haftet das Filtrierpapier im Deckel, der nun abgehoben wird. Hierauf tropft man auf das Filtrierpapier einige Tropfen Formalin und deckt wieder damit zu.

Bei sehr bakterienreichen Flüssigkeiten wird oft eine unmittelbare Zählung der Bakterien selbst notwendig werden. Nach *Winterberg*[2]) geschieht dieselbe auf folgende Weise: Gezählt wird in der schon von *Hueppe* und *Lafar* für diesen Zweck empfohlenen Zählkammer von *Thoma-Zeiss*. Dieselbe wird vor und nach dem Gebrauch zuerst in Sublimat 1:2000 Wasser, dann mit destilliertem Wasser gereinigt, mit 60%igem Alkohol, mit starkem Alkohol und endlich mit Äther abgespült und getrocknet. Die Deckgläschen werden ebenso vorbereitet. Man wählt mitteldicke Deckgläschen.

Als Verdünnungsflüssigkeit verwendet man eben hergestelltes destilliertes Wasser, das sich in einer sterilisierten Bürette befindet. Man verdünnt in kleinen Kölbchen. Wesentlich erleichtert wird das Zählen, wenn

---

[1]) *L. Heim*, Lehrb. d. Bakteriol. S. 483. Enke, Stuttgart (1906).

[2]) *H. Winterberg*, Zur Methodik der Bakterienzählung. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. **29**. S. 75 (1898).

man zur Verdünnungsflüssigkeit eine geringe Menge Methylenblau zusetzt, bis zur hellblauen Färbung. Es muß sehr gut nach der Einsaat der Bakterien geschüttelt werden, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung derselben im Substrat zu erreichen. Zur Zählung dient das Objektiv D und das Okular IV von *Zeiss*. Nachdem die beschickte, bedeckte Kammer etwa 10 Minuten ruhig auf dem horizontalen Mikroskoptisch gelegen ist, beginnt man mit der Zählung.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$x = \frac{n}{v} \cdot 250.000,$$

in der x die in 1 *cm*³ Zählflüssigkeit enthaltenen Keime bedeutet, n die Summe aller gezählten Keime, v die Anzahl der gezählten großen Quadrate.

Soll die Menge der Bakterien im Kubikzentimenter ursprünglicher Substanz bestimmt werden, so muß die verwendete Verdünnung und Menge der eingebrachten ursprünglichen Flüssigkeit noch in Rechnung gesetzt werden.

Auch diese Methode hat ihre Fehler und ergibt nicht absolut genaue Werte; immerhin verdient sie bei genaueren wissenschaftlichen Wachstums- und Vermehrungsversuchen angewendet zu werden.

Der Gang einer bakteriologischen Wasseruntersuchung wird immer der gleiche sein, nur werden mitunter andere Nährsubstrate verwendet, wenn es sich um ganz bestimmte Organismen handelt, auf deren Nachweis es ankommt, oder wenn die Wasseruntersuchung für einen bestimmten technischen Zweck ausgeführt wird. Für diese Fälle sei auf die „Mikroskopische Wasseranalyse“ von *Mez*[1]) verwiesen.

## Bodenuntersuchung.

Die oberflächlichen Erdproben entnimmt man mit einem sterilisierten Platinlöffel und gibt die Probe in ein sterilisiertes, vorher gewogenes Wägefläschchen, daß man in Eis gekühlt ins Laboratorium bringt.

Zur Entnahme der Erdproben aus größeren Tiefen bedient man sich des Bohrers nach *Fränkel*[2]), dessen Bohransatz Fig. 411 zeigt. Derselbe enthält eine Höhlung, die durch einen Schieber verschließbar ist. Dieser wird beim Eindrehen nach links durch den Widerstand des Bodens zugedrückt. Sobald man in der gewünschten Tiefe ist, dreht man nach rechts, wodurch der Schieber geöffnet wird und das Erdreich in das Innere des Bohransatzes vordringt. Durch eine weitere Linksdrehung wird die Kammer wieder geschlossen. Dann zieht man den Bohrer zurück und versorgt die Erdprobe sofort in einem sterilisierten Wägeglas.

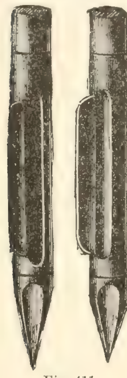
Zur genaueren Festsetzung der Keimzahl für eine bestimmte Menge Erde verfährt man auf folgende Weise nach *Hiltner* und *Störmer*[3]): Zur

[1]) *Mez*, Mikroskopische Wasseranalyse. Berlin 1898.

[2]) *C. Fränkel*, Untersuchungen über das Vorkommen von Mikroorganismen in verschiedenen Bodenschichten. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd 2, S. 521 (1887).

[3]) *L. Hiltner* und *K. Störmer*, Studien über die Bakterienflora des Ackerbodens mit besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens nach einer Behandlung mit Schwefel-

Plattenkultur verwendet man leicht alkalische Fleischwasserpeptongelatine folgender Zusammensetzung: Fleischbrühe 1000 *cm*³, Pepton 10 *g* — Kochsalz 5·0 *g* —, nach Neutralisierung Zusatz von 1·5 *g* Kristallsoda. Die Erdprobe wird im verschlossenen Wägegläschen samt demselben gewogen, dann rasch mit einem sterilisierten Platinlöffel von den verschiedenen Stellen der Probe kleine Portionen abgenommen, deren Gewicht zusammen etwa ¹/₂ *g* ausmacht. Das Wägeglas wird sofort geschlossen und neuerlich gewogen. So erhält man das Gewicht der feuchten, zur Keimzahlbestimmung verwendeten Erde. Diese Erdprobe wird mit 400 *cm*³ sterilisiertem Wasser übergossen und die Erdreste vom Platinlöffel damit hineingespült. Man schüttelt nun kräftig und gut durch und entnimmt der Aufschwemmung 1 *cm*³, den man in 100 *cm*³ sterilen Wassers verteilt. Diese zweite Verdünnung wird ebenfalls gründlich durchgemischt. Von ihr wird zu einer Platte je 1 *cm*³ genommen. Die Platten werden am besten nach der auf S. 1328 angegebenen Methode gegossen. Die Verdünnungen sind natürlich bei der Berechnung der Keimzahl für 1 *g* feuchte Erde in Rechnung zu setzen. Zweckmäßiger ist es, für 1 *g* trockene Erde die Mikroorganismenanzahl zu berechnen oder im ersteren Falle den Wassergehalt der Erdprobe anzugeben. Derselbe läßt sich leicht durch Trocknen bis zu konstantem Gewicht ermitteln.


Fig. 411.

Die Zählung der Platten erfolgt am achten Tage. Die Platten sind vollständig auszuzählen, da gut verwendbare Erdplatten nicht mehr als 120—150 Kolonien aufweisen sollen. Deshalb ist das Material reichlich zu verdünnen. Mittelst des Abstiftungsverfahrens (S. 1327) schaltet man wuchernde Kolonien aus.

Bezüglich der Artenbestimmung verweise ich auf die oben zitierte Abhandlung von *Hiltner* und *Störmer*.

## Luftuntersuchung.

Bei bakteriologischen Luftuntersuchungen werden die in einem bestimmten Luftvolumen vorhandenen Bakterien und Pilze quantitativ bestimmt, sofern dieselben überhaupt auf einem künstlichen Nährsubstrat sich zu vermehren vermögen.

Eine annähernd genaue Bestimmung der Keimzahl bzw. auch der Arten erhält man mit folgender Zusammenstellung: Dieselbe besteht aus zwei Absorptionsröhren für die mit der Luft angesaugten Bakterien und Pilzsporen, dann einem Wattefilter und einem Ansauger. Das erste Absorptionsgefäß ist eine Proberöhre, die ungefähr 10 *cm*³ Wasser enthält und mit einem doppelt durchbohrten Kautschukstopfen verschlossen ist. Durch denselben geht ein bis zum Boden ragendes, oben abgebogenes

kohlenstoff und nach Brache. Arb. a. d. biologischen Abteil. f. Land- u. Forstwirtschaft am kais. Gesundheitsamt. Bd. 3. S. 446 ff. (1903).

Glasrohr und ein zweites kurzes, das noch einen einfach gebohrten Kautschukstopfen trägt. Dieses Gefäß samt den eingesetzten Glasröhren wird im Dampfschrank sterilisiert, nachdem das längere Rohr mit einem Wattebäuschchen verschlossen wurde, während die Öffnung des zweiten Rohres unverschlossen bleibt. Sofort nach dem Entnehmen aus dem Dampfschrank stülpt man über den Kautschukstopfen ein passendes, mitsterilisiertes kurzes Proberöhrchen. Das zweite Absorptionsgefäß ist ein Glasrohr, das auf beiden Seiten mit fest zusammengedrückten Wattebäuschen verschlossen ist und in diesem Zustand der trockenen Sterilisation bei 150° ausgesetzt wird. Vor dem Gebrauch verflüssigt man ein Röhrchen mit Nährgelatine, überzieht den einen Wattebausch mit einer wasserdichten Kautschukkappe,

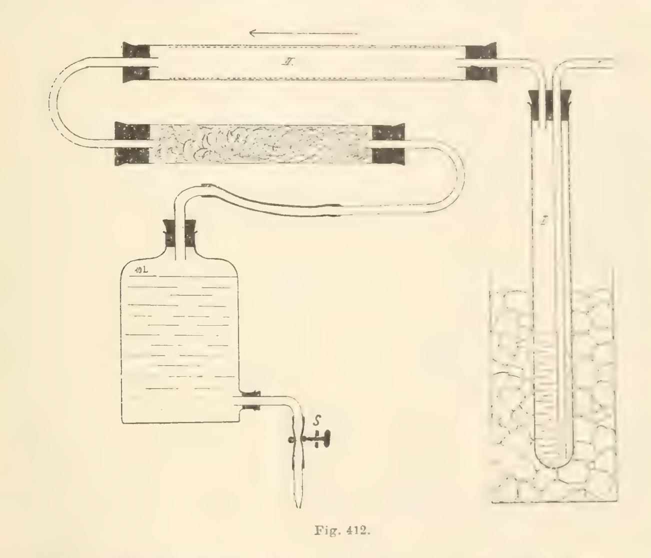



Fig. 412.

entfernt den zweiten Bausch, gießt nach Abglühen des Randes der Eprouvette die Gelatine hinein und verschließt wieder mit dem Wattebausch. Jetzt zieht man auch über diesen eine Kautschukkappe und rollt nun das beiderseits wasserdicht verschlossene Rohr in horizontaler Lage in Eiswasser, bis die Gelatine erstarrt. So wird das Rohr im Innern mit Nährsubstanz ausgekleidet (punktiert in der Fig. 412). Das Wattefilter trägt beiderseits zwei halbkreisförmige Verbindungsrohre, von denen das eine einen in das zweite Absorptionsgefäß passenden Kautschukstopfen trägt. Auf denselben wird bei der Sterilisation im Dampftopf eine Eprouvette gesteckt, die bis zum Gebrauche oben bleibt. Den ganzen Apparat, der gebrauchsfertig im Schnitt in Fig. 412 wiedergegeben ist, stellt man folgendermaßen zusammen:

Das erste Absortionsgefäß (Fig. 412, *I*) verbindet man mit dem zweiten Absorptionsgefäß (*II*) nach Abnahme des den Kautschukstoppel bedeckenden Proberöhrchens und Entfernung des mit Gelatine benetzten Wattebausches des zweiten Gefäßes. Nunmehr setzt man an letzteres das Wattefilter, indem man vom Absorptionsgefäß *II* den zweiten Wattebausch entfernt und nach Abnahme der Glaskappe vom Stopfen des Filteransatzes denselben in das zweite Absorptionsgefäß luftdicht einfügt. Das zweite Röhrchen des Filters wird durch einen Kautschukschlauch mit dem Ansauger verbunden. Als solcher dient einfach eine große, 10 *l* fassende Flasche, die einen seitlichen Tubus am Boden trägt. Im Flaschenhals sitzt luftdicht ein Stopfen aus Kautschuk mit einem kurzen Glasrohr, das durch einen Schlauch mit dem Filter verbunden wird. Im unteren Tubus befindet sich ein zweites Rohr, das durch einen kurzen Schlauch mit dem Ausflußröhrchen verbunden ist. Durch Einstellen des Schraubenhahnes *S* wird der Abfluß so reguliert, daß ungefähr in der Stunde 2 *l* ablaufen. Um die nötige Menge Luft durchzusaugen, ist natürlich die Saugflasche nach dem Entleeren neuerlich zu füllen, was beliebig oft geschehen kann. Bevor man zur Neufüllung die Flasche öffnet, sperrt man den Luftstrom durch einen eingelegten Quetschhahn am Verbindungsschlauch zwischen Flasche und Wattefilter. Das ausfließende Wasser wird in einer zweiten Flasche aufgefangen und dann abgemessen. Die erhaltene Menge entspricht dem Volumen der angesaugten Luft. Erst jetzt entfernt man das Wattebäuschchen des langen Rohres vom Gefäß *I*. Letzteres wird während der Dauer des Ansaugens bis zur Herstellung der Platten in Eis gekühlt, um eine Vermehrung der eingeführten Bakterien möglichst zu vermeiden. Eine absolut genaue Messung des Luftvolumens ist bei dieser Methode wegen den äußeren Temperatur- und Druckschwankungen natürlich nicht möglich.

Nachdem die gewünschte Anzahl von Litern Luft (mindestens 15) durchgeleitet ist, sperrt man den Schraubenhahn, löst die Verbindung zwischen Ansauger und Wattefilter und entfernt letzteres vom Absorptionsgefäß *II*, das sofort mit einem sterilen Wattebausch verschlossen wird. Nunmehr wird das Absorptionsgefäß *II* weggenommen und das zweite Ende desselben ebenfalls mit einem sterilisierten Wattebausch verschlossen. So kommt es in den Thermostaten mit 20° C. An seine Stelle fügt man das Wattefilter. Jetzt verflüssigt man 11 Röhrchen mit 5—10 $cm^3$ Nährgelatine und hält sie ca. 35° warm. Dann bringt man auf eine nivellierte Steinplatte oder besser auf den horizontalgestellten Plattenkühlapparat (S. 1231) 11 Petrischalen mit ebenen Böden. Durch Einblasen ins Wattefilter drückt man die vorher gut durchgeschüttelte Flüssigkeit des Absorptionsgefäßes (*I*) durch das längere Rohr heraus in 10 Petrischalen. Demnach kommt in jede Schale ca. 1 $cm^3$, den man auf möglichst viele Stellen des Schalenbodens verteilt. In jede Schale wird jetzt nach Abflammen des Glasrandes die Nährgelatine gegossen und durch vorsichtiges Umschwenken eine gleichmäßige Durchmischung erzielt. Dann läßt man erstarren. Man muß be-

sonders darauf achten, daß der Deckel nicht von Gelatine benetzt wird. Das elfte Gelatineröhrchen entleert man in das Absorptionsgefäß (*I*) und nach Aufsetzen der Glasröhren mischt man wieder gut und läßt durch Lufteinblasen die ganze Menge durchs lange Rohr in eine Petrischale ausfließen. Sämtliche Platten werden bei 20—22° C gehalten.

Die Summe der in sämtlichen Schalen (11) angegangenen Kolonien mehr den etwa auf dem Nährboden des Absorptionsgefäßes (*II*) entstandenen Auflagerungen entspricht der Anzahl gelatinewüchsiger Bakterien und Pilze im gemessenen Luftquantum. Man kann für bestimmte Zwecke natürlich jeden anderen Nährboden nehmen. Die Methode ist, wie alle diese, nur annähernd genau, gestattet aber eine sehr bequeme Zählung, die entsprechend den Darlegungen auf S. 1329 vorzunehmen ist.

Eine andere recht brauchbare Methode, die ein rascheres Arbeiten gestattet, wurde von *Martin Ficker*[1]) ausgearbeitet: Bei derselben wird ein gemessenes Luftquantum durch ein Filter aus Glaskrümeln verschiedener Korngröße geleitet und dieselben samt den daran haftenden Bakterien mit Nährgelatine zu Platten verarbeitet. Nach dem genannten Autor ist diese Methode folgendermaßen auszuführen:

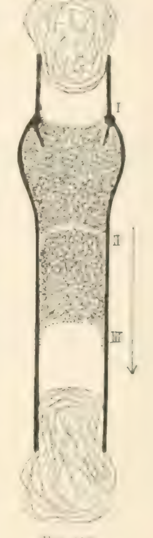


Fig. 413.

Durchsichtige, farblose, erbsengroße Glasperlen werden geglüht und heiß in kaltes Wasser geworfen. Nach dem Trocknen zerstößt man sie im Mörser und siebt sie durch zwei Siebe, zuerst durch eines mit 0·5 *mm* Maschenweite und dann durch ein zweites mit 0·25 *mm* Maschendurchmesser. Beide Korngrößen werden für sich mehrmals im Wasser gewaschen und getrocknet. Zum Gebrauch werden gemischt $^3/_4$ Volumteile größere Körner und $^1/_4$ Volumteil kleinere (0·25).

Als Filterröhre dient ein Glasrohr, dessen Länge 9—10 *cm*, dessen innere Lichte 1·7 *cm*, im ausgebauchten Teil 2·3 *cm* beträgt. Der obere kurze Ansatz ragt etwa 5 *mm* in die Ausbauchung hinein. In Fig. 413 ist der Längsschnitt des Rohres wiedergegeben. Bei der Füllung wird zuerst ein sehr feinmaschiges Drahtnetz (Fig. 413, *I*) mit der Konvexität nach unten eingeschoben, das Rohr umgekehrt und die Glaskörnermischung portionenweise eingefüllt. Jede Portion wird gut zusammengeschüttelt. Wenn die Füllung etwa 2·5—2·7 *cm* hoch ist, wird ein zweites Drahtnetz (*II*) eingeschoben und ebenso eine zweite, 2—2·5 *cm* hohe Füllung mit Glaskörnern eingetragen. Dieselbe wird ebenfalls mit einem Drahtnetze (*III*) bedeckt. Dann werden beide Enden mit Wattebäuschen verschlossen und die gefüllte

---

[1]) *Martin Ficker*, Zur Methodik der bakteriologischen Luftuntersuchung. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 22. S. 33 (1896).

Röhre 2 Stunden im Trockensterilisator bei 160° C erhitzt. Als Aspirator dient eine Wasserstrahlpumpe oder ein einfaches Gummigebläse mit dazwischen geschaltetem, sterilisierten Wattefilter, das unten angeschlossen wird. Das Gummigebläse muß derart mit Ventilen versehen sein, daß beim Zusammenpressen desselben die Luft rückwärts entweicht, indem ein zwischen Gummiball und Filter eingelegtes Ventil geschlossen wird. Beim Loslassen des Ballons muß sich diese Öffnung schließen und die Luft langsam durchs Filter in der Richtung des Pfeiles einströmen, nachdem man den Wattebausch entfernt hat. Zur Messung des durchgesaugten Luftquantums muß der Rauminhalt des Gummiballons bestimmt und damit die Anzahl der vorgenommenen Füllungen multipliziert werden.

Das Durchsaugen wird so vorgenommen, daß in der Minute etwa 2—4 *l* Luft das Filter passieren. Verwendet man eine Wasserstrahlpumpe, so schaltet man zwischen das Wattefilter und letztere eine Gasuhr. Nach *Ficker* soll die Menge der gesamten durchgesaugten Luft etwa 50 *l* betragen.

Nach Beendigung der Luftfiltration wird die Außenwand des Filters mit Sublimat, Alkohol und Äther desinfiziert *(Ficker)*, das Filter abgenommen, der untere Rand abgeglüht, mit einem sterilen Häkchen das Drahtsieb *III* entfernt und der Inhalt des Kontrollfilters in 4 Petrischalen verteilt. Dann wird das nächste Drahtnetz *(II)* entfernt und die Glaskörner der eigentlichen Filterschicht in 8 Schalen verteilt. Die Proben werden mit Nährmaterial (Gelatine oder Agar) versehen und bei 22° bzw. 35° C gehalten und in der üblichen Weise gezählt.

Die 4 Platten mit dem Kontrollfilterinhalt bleiben bei gut durchgeführter Filtration steril, da alle Bakterien bereits vom ersten Filter (zwischen Netz *I* und *II*) abgefangen werden sollen.

# Methoden zur Herstellung bestimmter Wasserstoffionenkonzentrationen.

Von **Leonor Michaelis**, Berlin.

Obgleich es seit längerer Zeit bekannt ist, daß die sogenannte „Reaktion“ einer Flüssigkeit nur durch die Konzentration entweder der Wasserstoffionen oder der Hydroxylionen bestimmt ist, werden merkwürdigerweise von Physiologen und von Chemikern immer noch Verstöße gegen diese Erkenntnis begangen. Wenn z. B. zu einer gegebenen Menge Wasser und andrerseits zu der gleichen Menge Serum eine bestimmte Menge Salzsäure zugegeben wird, so wird noch heutzutage von vielen die Azidität dieser beiden Flüssigkeiten, weil sie ja die gleiche Menge Salzsäure enthalten, mit Unrecht als gleich angesehen. Oder es wird die Alkalität des Blutes einer Sodalösung von bestimmter Konzentration gleichgesetzt. Das hat zwar seine Berechtigung, wenn man die Titrationsalkaleszenz erfahren will, nicht aber wenn es sich um die wirkliche Alkalität handelt. Den Unterschied erkennt man am besten durch folgendes Beispiel: Bestimmt man durch Titration mit Methylorange als Indikator die Alkalität einer normalen Natronlauge und einer normalen Sodalösung, so findet man beide gleich, und doch wird es niemandem einfallen, die beiden Lösungen für gleich stark alkalisch zu halten. Wie nun die Wasserstoff- oder Hydroxylionenkonzentration in irgend einer Flüssigkeit bestimmt wird, ist in Band I von *Friedenthal* beschrieben worden. Hier soll nun gezeigt werden, in welcher Weise man einer Flüssigkeit eine gewünschte Azidität oder Alkalität willkürlich erteilen kann. Wir müssen nun zwischen zwei Fällen unterscheiden. Entweder handelt es sich um Lösungen, welche nur solche Substanzen enthalten, die an sich kein oder fast kein säure- und alkalibindendes Vermögen besitzen. Will man z. B. einer Lösung eines Kohlehydrats eine bestimmte Reaktion erteilen, so liegt ein solcher Fall vor; auch wenn in der Lösung außerdem noch der absoluten Menge nach geringe Mengen eines Fermentes oder geringe Mengen von Eiweiß vorhanden sind, so ändert sich noch nicht viel. Oder aber es handelt sich um solche Lösungen, welche in merklicher Weise Säuren oder Alkalien

binden. Das sind also Lösungen, welche von vornherein Alkalien, Säuren, Karbonate, Phosphate, Acetate, Aminosäuren, größere Mengen Eiweiß enthalten.

Wir beginnen mit dem ersten einfacheren Fall. Man habe z. B. die Aufgabe, einer Zuckerlösung[1]) eine ganz bestimmte Reaktion zu erteilen. Handelt es sich um extrem saure oder alkalische Reaktionen, so erreicht man das einfach durch Zusatz von Salzsäure oder Natronlauge. Da diese fast vollkommen elektrolytisch dissoziiert sind, so ist die H·-Ionenkonzentration einer H Cl-Lösung folgende:

| H Cl-Gehalt in Normalität | [H·] ungefähr (d. h. bei Annahme totaler Dissoziation) in Normalität | [H·] genauer (d. h. bei Berücksichtigung des Dissoziationsgrades |
|---|---|---|
| 1 | 1 | 0·78 $= 0{\cdot}78 \,.\, 10^{0}$ |
| 0·1 | 0·1 | 0·091 $= 0{\cdot}91 \,.\, 10^{-1}$ |
| 0·01 | 0·01 | 0·0096 $= 0{\cdot}96 \,.\, 10^{-2}$ |
| 0·001 | 0·001 | 0·00098 $= 0{\cdot}98 \,.\, 10^{-3}$ |

und für Na OH gilt:

| Na OH-Gehalt in Normalität | [OH'] ungefähr | [OH'] genauer |
|---|---|---|
| 1 | 1 | 0·77 $= 0{\cdot}77 \,.\, 10^{0}$ |
| 0·1 | 0·1 | 0·089 $= 0{\cdot}89 \,.\, 10^{-1}$ |
| 0·01 | 0·01 | 0·0095 $= 0{\cdot}95 \,.\, 10^{-2}$ |
| 0·001 | 0·001 | 0·00098 $= 0{\cdot}98 \,.\, 10^{-3}$ |

Schwächere Lösungen als $^1/_{1000}$-Normallösungen anzuwenden, ist illusorisch, weil dann der störende Einfluß der in wechselnder Menge vorhandenen Kohlensäure aus der Luft und das Alkali, das sich aus der Glaswand ablöst, zu stören beginnen. Mit schwachen Säuren oder Alkalien kann man aber auch in diesen Gebieten eine größere Genauigkeit erzielen. Es ist z. B. eine $^1/_{100}$-normale Essigsäure nur zu rund 4% dissoziiert, und man kann mit ihr daher eine H-Ionenkonzentration von 0·0004 Normalität herstellen. Angenommen nun, es befinde sich in der Lösung soviel Alkali, daß der zehnte Teil der gesamten Essigsäure gebunden würde, so daß wir nur noch eine 0·009 Normalessigsäure hätten, so liefert doch diese Essigsäurekonzentration fast genau dieselbe H-Ionenkonzentration wie die stärkere. Denn bei schwachen Säuren ist die H-Ionenkonzentration nicht der Gesamtsäuremenge, sondern ihrer Quadratwurzel proportional. Im allgemeinen gilt für schwache Säuren nämlich das Gesetz:

$$[H^{\cdot}] = \sqrt{k.[\text{Säure}]},$$

wo k die Dissoziationskonstante der Säure und die Klammern die Kon-

[1]) *L. Michaelis* und *P. Rona*, Untersuchungen über das glykolytische Ferment. Biochem. Zeitschr. Bd. **23**. S. 364 (1910).

zentration der eingeklammerten Molekülgattung bedeuten. Die Dissoziationskonstante k der Essigsäure ist nun[1]) bei:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 0° . . . | $1{\cdot}77 \,.\, 10^{-5}$ | 37° . . . | $1{\cdot}82 \,.\, 10^{-5}$ |
| 10° . . . | $1{\cdot}83 \,.\, 10^{-5}$ | 40° . . . | $1{\cdot}81 \,.\, 10^{-5}$ |
| 15° . . . | $1{\cdot}85 \,.\, 10^{-5}$ | 50° . . . | $1{\cdot}74 \,.\, 10^{-5}$ |
| 25° . . . | $1{\cdot}86 \,.\, 10^{-5}$ | 60° . . . | $1{\cdot}66 \,.\, 10^{-5}$ |

Die Dissoziationskonstante der Essigsäure ist also angenehmerweise von der Temperatur fast unabhängig und kann daher zwischen 0° und 50° ohne merklichen Fehler

$$k = 1{\cdot}8 \,.\, 10^{-5}$$

gesetzt werden.

Daher hat eine Essigsäurelösung folgenden H·-Ionengehalt (fast unabhängig von der Temperatur zwischen 0° und 50°):

| Normalität der Essigsäure | [H·] Normalität | | |
|---|---|---|---|
| 1 | 0·0042 | oder | $0{\cdot}42 \,.\, 10^{-2}$ |
| 0·1 | 0·0013 | | $0{\cdot}13 \,.\, 10^{-2}$ |
| 0·01 | 0·00042 | | $0{\cdot}42 \,.\, 10^{-3}$ |
| 0·001 | 0·00013 | | $0{\cdot}13 \,.\, 10^{-3}$ |

Ebenso gilt für Ammoniak:

$$[OH'] = \sqrt{k \,.\, [\text{Ammoniak}]},$$

wo k für:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 0° . . . | $1{\cdot}39 \,.\, 10^{-5}$ | 37° . . . | $1{\cdot}96 \,.\, 10^{-5}$ |
| 10° . . . | $1{\cdot}62 \,.\, 10^{-5}$ | 40° . . . | $1{\cdot}98 \,.\, 10^{-5}$ |
| 15° . . . | $1{\cdot}71 \,.\, 10^{-5}$ | 50° . . . | $1{\cdot}98 \,.\, 10^{-5}$ |
| 20° . . . | $1{\cdot}80 \,.\, 10^{-5}$ | 60° . . . | $1{\cdot}93 \,.\, 10^{-5}$ |
| 25° . . . | $1{\cdot}87 \,.\, 10^{-5}$ | | |

Daher hat eine Ammoniaklösung bei 20°:

| Ammoniak-Normalität | [OH'] | [H·] |
|---|---|---|
| 1 | $0{\cdot}0042 = 0{\cdot}42 \,.\, 10^{-2}$ | $1{\cdot}8 \,.\, 10^{-12}$ |
| 0·1 | $0{\cdot}0013 = 0{\cdot}13 \,.\, 10^{-2}$ | $0{\cdot}57 \,.\, 10^{-11}$ |
| 0·01 | $0{\cdot}00042 = 0{\cdot}42 \,.\, 10^{-3}$ | $1{\cdot}8 \,.\, 10^{-11}$ |
| 0·001 | $0{\cdot}00013 = 0{\cdot}13 \,.\, 10^{-3}$ | $0{\cdot}57 \,.\, 10^{-10}$ |

Die Berechnung von [OH'] erfolgt in dieser Weise direkt. Da wir die Reaktion gewöhnlich durch [H·] ausdrücken, so können wir auch diese berechnen durch die Beziehung

$$[H^{\cdot}] \,.\, [OH'] = k_w,$$

wo $k_w$ für verschiedene Temperaturen folgende Werte[2]) hat:

---

[1]) *Harald Lundén*, Hydrolyse des sels des acides faibles etc. Journ. de Chimie physique, T. 5, p. 574 (1907).

[2]) Nach den neuesten Messungen von *Lundén*, l. c.

**Dissoziationskonstante des Wassers zwischen 10° und 50°.**

| | | | |
|---|---|---|---|
| 10° . . . | $0{\cdot}31 . 10^{-14}$ | 25° . . . | $1{\cdot}05 . 10^{-14}$ |
| 15° . . . | $0{\cdot}46 . 10^{-14}$ | 37° . . . | $2{\cdot}56 . 10^{-14}$ |
| 18° . . . | $0{\cdot}58 . 10^{-14}$ | 40° . . . | $2{\cdot}94 . 10^{-14}$ |
| 20° . . . | $0{\cdot}76 . 10^{-14}$ | 50° . . . | $5{\cdot}17 . 10^{-14}$ |

Eine genau neutrale wässerige Lösung hat daher folgende H·- oder OH'-Konzentration:

| | | | |
|---|---|---|---|
| bei 10° . . . . . . | $0{\cdot}56 . 10^{-7}$ | 25° . . . . . . | $1{\cdot}02 . 10^{-7}$ |
| 15° . . . . . . | $0{\cdot}68 . 10^{-7}$ | 37° . . . . . . | $1{\cdot}60 . 10^{-7}$ |
| 18° . . . . . . | $0{\cdot}76 . 10^{-7}$ | 40° . . . . . . | $1{\cdot}71 . 10^{-7}$ |
| 20° . . . . . . | $0{\cdot}87 . 10^{-7}$ | 50° . . . . . . | $2{\cdot}24 . 10^{-7}$ |

Mit Benutzung dieser Werte finden wir als Ergänzung der obigen Tabelle, für Ammoniak für 20°, nunmehr für 37° C:

| Ammoniaknormalität | [OH'] | | [H·] |
|---|---|---|---|
| 1 | 0·0044 | $= 0{\cdot}44 . 10^{-2}$ | $0{\cdot}58 . 10^{-11}$ |
| 0·1 | 0·0014 | $= 0{\cdot}14 . 10^{-2}$ | $1{\cdot}8 \ . 10^{-11}$ |
| 0·01 | 0·00044 | $= 0{\cdot}44 . 10^{-3}$ | $0{\cdot}58 . 10^{-10}$ |
| 0·001 | 0·00014 | $= 0{\cdot}14 . 10^{-3}$ | $0{\cdot}18 . 10^{-10}$ |

Man beachte, daß in einer Ammoniaklösung [OH'] von der Temperatur fast unabhängig, [H·] dagegen stark abhängig ist. Das liegt daran, daß die Dissoziationskonstante des Ammoniaks von der Temperatur nur wenig, die des Wassers stark beeinflußt wird.

Mit Hilfe von Essigsäure kann man so mit ziemlicher Genauigkeit H-Ionenzentrationen etwa zwischen $10^{-3}$ und $10^{-4}$ herstellen, wo gerade die Salzsäure ungenau zu werden beginnt, und mit Hilfe von Ammoniak von etwa $10^{-11}$ bis $10^{-10}$, wo die Natronlauge zu versagen beginnt. Es bleibt nun noch das für die Physiologie bei weitem wichtigste Gebiet, zwischen $10^{-3}$ und $10^{-10}$, also um den Neutralitätspunkt (ca. $10^{-7}$) herum auszufüllen. Um dies zu erreichen, machen wir von dem Umstand Gebrauch, daß man die Dissoziation der Essigsäure durch ihre Alkalisalze, die des Ammoniaks durch sein Chlorid herabdrücken kann.

Beginnen wir mit dem

## Acetatgemisch.[1])

Die Alkalisalze der schwachen Säuren, wie es die Essigsäure ist, sind viel stärker dissoziiert als die freie Säure. Natriumacetat ist, wie Na Cl, in normaler Lösung zu 80%, in $^1/_{10}$-Normallösung zu 90%, und in noch schwächerer Lösung fast vollkommen, fast zu 100%, in Na·-Ionen und Acetat-Ionen, $CH_3COO'$, dissoziiert. Nehmen wir vorläufig mit einer gewissen Annäherung an die Wahrheit stets vollkommene Dissoziation an. Die Essig-

[1]) Zuerst hierfür systematisch angewendet von *Fels*, Studien über Indikatoren. Zeitschr. f. Elektrochemie. Bd. **10**, S. 208 (1904).

säure dagegen ist stets nur zu wenigen Prozenten dissoziiert, und wenn ihre Dissoziation durch die Gegenwart von Natriumacetat noch weiter herabgedrückt, ist so außerordentlich wenig dissoziiert (meist weniger als zu 0·1%), daß man mit großer Annäherung sagen kann, die Essigsäure sei gar nicht dissoziiert. Es ist daher in einem solchen Gemisch die Konzentration von $CH_3COO'$ gleich der des gesamten Natriumacetats, die Konzentration von $CH_3COOH$ gleich der der gesamten „freien" Essigsäure. Nun existiert aber eine Beziehung zwischen $H^{\cdot}$, $CH_3COO'$ und $CH_3COOH$ nach dem Massenwirkungsgesetz:

$$\frac{[CH_3COO'] . [H^{\cdot}]}{[CH_3COOH]} = k,$$

wo k die Dissoziationskonstante der Essigsäure ist, die wir, wie oben, von der Temperatur fast unabhängig $= 1{\cdot}8 . 10^{-5}$ setzen können.

Daher ist in einem Gemisch von Essigsäure und Natriumacetat

$$[H^{\cdot}] = 1{\cdot}8 . 10^{-5} . \frac{[\text{Essigsäure}]}{[\text{Natriumacetat}]}.$$

Hieraus folgt, daß $[H^{\cdot}]$ nur von dem Verhältnis von Essigsäure zu Natriumacetat, nicht von der absoluten Menge derselben abhängig ist. Wenn wir also Lösungen von Essigsäure und von Natriumacetat von gleicher Normalität miteinander vermischen, so erhalten wir, indem wir das Verhältnis der beiden Lösungen ändern, folgende Werte für $[H^{\cdot}]$:

| $\frac{\text{Essigsäure}}{\text{Natriumacetat}}$ | $= [H^{\cdot}]$ | $\frac{\text{Essigsäure}}{\text{Natriumacetat}}$ | $= [H^{\cdot}]$ |
|---|---|---|---|
| $^{32}/_{1}$ | $5{\cdot}76 . 10^{-4}$ | $^{1}/_{2}$ | $0{\cdot}90 . 10^{-5}$ |
| $^{16}/_{1}$ | $2{\cdot}88 . 10^{-4}$ | $^{1}/_{4}$ | $0{\cdot}45 . 10^{-5}$ |
| $^{8}/_{1}$ | $1{\cdot}44 . 10^{-4}$ | $^{1}/_{8}$ | $0{\cdot}22 . 10^{-5}$ |
| $^{4}/_{1}$ | $0{\cdot}72 . 10^{-4}$ | $^{1}/_{16}$ | $0{\cdot}11 . 10^{-5}$ |
| $^{2}/_{1}$ | $0{\cdot}36 . 10^{-4}$ | $^{1}/_{32}$ | $0{\cdot}56 . 10^{-6}$ |
| $^{1}/_{1}$ | $1{\cdot}80 . 10^{-5}$ | $^{1}/_{64}$ | $0{\cdot}28 . 10^{-6}$ |

Genauer wird die Rechnung noch, wenn wir den Dissoziationsgrad des Natriumacetats mit in Betracht ziehen. Enthalten die definitiven Mischungen das Natriumacetat in $^{1}/_{1}$ normaler Konzentration, so muß man die Werte der Tabelle mit 0·8 multiplizieren, enthalten sie sie in $^{1}/_{10}$ normaler Konzentration, mit 0·9; schon das braucht man in praxi nicht mehr zu berücksichtigen, und bei noch verdünnteren Lösungen braucht man in praxi überhaupt keine Korrektur anzubringen. Hat man also z. B. die Aufgabe, eine 1%ige Zuckerlösung auf $[H^{\cdot}] = 0{\cdot}9 . 10^{-5}$ zu bringen, so nimmt man eine höher konzentrierte, etwa 2%ige Zuckerlösung, versetzt sie z. B. mit $^{1}/_{10}$ Volumen eines Gemisches von 1 Teil $^{1}/_{10}$-Normalessigsäure + 2 Teilen $^{1}/_{10}$-Normalnatriumacetat und füllt sie mit destilliertem Wasser auf, bis die Zuckerkonzentration 1% beträgt.

## Ammoniumgemische.[1])

Genau in derselben Weise folgt, daß in einem Gemisch von Ammoniak und Chlorammon

$$[OH'] = k \cdot \frac{[\text{Ammoniak}]}{[\text{Chlorammon}]}$$

ist. Hier ist k die Dissoziationskonstante des Ammoniaks. Da wir die Reaktion lieber durch [H·] als durch [OH'] ausdrücken, so berücksichtigen wir, daß

$$[H^{\cdot}] = \frac{k_w}{[OH']},$$

wo $k_w$ die Dissoziationskonstante des Wassers ist.

Also ist in einem Ammoniumgemisch:

$$[H^{\cdot}] = \frac{k_w}{k} \cdot \frac{[\text{Chlorammon}]}{[\text{Ammoniak}]}.$$

Nun beträgt bei 18° $\frac{k_w}{k} = 0{\cdot}32 \cdot 10^{-9}$,

bei 37° $\frac{k_w}{k} = 1{\cdot}31 \cdot 10^{-9}$.

Es ist also [H·] in verschiedenen Ammoniumgemischen:

| $\frac{\text{Chlorammon}}{\text{Ammoniak}}$ = | [H·] bei 18° | [H·] bei 37° |
|---|---|---|
| 32/1 | $1{\cdot}02 \cdot 10^{-8}$ | $4{\cdot}19 \cdot 10^{-8}$ |
| 16/1 | $0{\cdot}51 \cdot 10^{-8}$ | $2{\cdot}10 \cdot 10^{-8}$ |
| 8/1 | $0{\cdot}26 \cdot 10^{-8}$ | $1{\cdot}05 \cdot 10^{-8}$ |
| 4/1 | $0{\cdot}13 \cdot 10^{-8}$ | $0{\cdot}52 \cdot 10^{-8}$ |
| 2/1 | $0{\cdot}64 \cdot 10^{-9}$ | $0{\cdot}26 \cdot 10^{-8}$ |
| 1/1 | $0{\cdot}32 \cdot 10^{-9}$ | $0{\cdot}13 \cdot 10^{-8}$ |
| 1/2 | $0{\cdot}16 \cdot 10^{-9}$ | $0{\cdot}65 \cdot 10^{-9}$ |
| 1/4 | $0{\cdot}80 \cdot 10^{-10}$ | $0{\cdot}33 \cdot 10^{-9}$ |
| 1/8 | $0{\cdot}40 \cdot 10^{-10}$ | $0{\cdot}17 \cdot 10^{-9}$ |
| 1/16 | $0{\cdot}20 \cdot 10^{-10}$ | $0{\cdot}82 \cdot 10^{-10}$ |
| 1/32 | $1{\cdot}0 \cdot 10^{-11}$ | $0{\cdot}41 \cdot 10^{-10}$ |

Die Berechnung der H-Ionenkonzentration sowohl in Acetat- wie in Ammoniumgemischen verliert ihre Gültigkeit, wenn die beiden Komponenten des Gemisches ein extrem großes oder kleines Verhältnis zueinander haben. Man tut deshalb gut, in Fällen, die auf die Genauigkeit hohe Ansprüche

[1]) *Fels*, l. c.

stellen, nur Gemische zu verwenden, bei denen das Verhältnis der beiden Komponenten etwa zwischen 30 : 1 und 1 : 30 liegt. Dann bleibt aber zwischen den der Neutralität am nächsten liegenden Gemischen der Acetate und der Ammoniumgemische ein Bereich von $0{\cdot}5 . 10^{-6}$ bis $1 . 10^{-8}$, welches wir noch nicht herstellen können. Diese Lücke füllen nun die

## Phosphatgemische [1])

aus. Diese bestehen in Mischungen von primärem und von sekundärem Natriumphosphat. Als Ausgangslösungen braucht man dazu genau hergestellte Lösungen dieser beiden Salze. Nach meinen neueren Erfahrungen ist nun viel einfacher, als die Salze selbst rein und mit einem bekannten und konstanten Kristallwassergehalt herzustellen, folgende Methode: Man stelle eine Lösung von 1 *g*-Mol. Phosphorsäure im Liter her. Die Bestimmung der Phosphorsäure darf aber nicht durch azidimetrische Titration geschehen. (Eine diesen Bedingungen genügende Lösung ist von *Kahlbaum* zu beziehen.) Zu 100 $cm^3$ davon gebe man 100 $cm^3$ n. $NaOH$ und 100 $cm^3$ Wasser, das ist die eine Stammlösung: $^1/_3$ n. primäres Phosphat. Zu anderen 100 $cm^3$ der Phosphorsäure gebe man 200 $cm^3$ n. $NaOH$; das ist die zweite Stammlösung: $^1/_3$ n. sekundäres Phosphat.

Nun ist primäres Phosphat fast vollkommen in folgender Weise dissoziiert:

$$NaH_2PO_4 = Na^{\cdot} + H_2PO_4'$$

und sekundäres Phosphat in folgender Weise:

$$Na_2HPO_4 = 2\,Na^{\cdot} + HPO_4''.$$

Wir haben also in einem Gemisch von primärem und sekundärem Phosphat fast genau soviel einwertige Phosphorsäure-Ionen $H_2PO_4'$, als wir primäres Phosphat darin gelöst haben, und soviel zweiwertige Phosphorsäure-Ionen $HPO_4''$, als wir sekundäres Phosphat gelöst haben. Nun besteht folgende Beziehung zwischen $H^{\cdot}$ und den beiden genannten Phosphationen:

$$[H^{\cdot}] . [HPO_4''] = k\,[H_2PO_4'] \quad \text{oder}$$

$$[H^{\cdot}] = k . \frac{[H_2PO_4']}{[HPO_4'']}$$

k beträgt für 18° $2{\cdot}0 . 10^{-7}$,
„ 37° $2{\cdot}4 . 10^{-7}$.

Es ist also in einem Phosphatgemisch

$$[H^{\cdot}] = 2{\cdot}0 . 10^{-7} . \frac{[\text{primäres Phosphat}]}{[\text{sekundäres Phosphat}]}$$

für 18°; für 37° hat man $2{\cdot}4 . 10^{-7}$ zu setzen. Demnach haben Phosphatgemische folgende $H^{\cdot}$-Konzentrationen:

---

[1]) *Szili*, vgl. darüber *H. Freudenthal*, Die Bestimmung der Reaktion einer Flüssigkeit. Zeitschr. f. Elektrochemie. Jgg. **1904**. S. 113. — *L. J. Henderson* und *O. F. Black*, A study of equilibrium between carbonic acide etc. Americ. Journ. of Physiol. Bd. 21. S. 420 (1908). — *L. Michaelis* und *P. Skwirsky*, Der Einfluß der Reaktion auf die spezifische Hämolyse. Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Bd. **4**, S. 357 (1910).

| primäres Phosphat / sekundäres Phosphat | $[H^{\cdot}]$ bei 18° | $[H^{\cdot}]$ bei 37° |
|---|---|---|
| $^{32}/_{1}$ | $0{\cdot}64 . 10^{-5}$ | $0{\cdot}77 . 10^{-5}$ |
| $^{16}/_{1}$ | $0{\cdot}32 . 10^{-5}$ | $0{\cdot}38 . 10^{-5}$ |
| $^{8}/_{1}$ | $0{\cdot}16 . 10^{-5}$ | $0{\cdot}19 . 10^{-5}$ |
| $^{4}/_{1}$ | $0{\cdot}80 . 10^{-6}$ | $0{\cdot}96 . 10^{-6}$ |
| $^{2}/_{1}$ | $0{\cdot}40 . 10^{-6}$ | $0{\cdot}48 . 10^{-6}$ |
| $^{1}/_{1}$ | $0{\cdot}20 . 10^{-6}$ | $0{\cdot}24 . 10^{-6}$ |
| $^{1}/_{2}$ | $1{\cdot}0 \ . 10^{-7}$ | $1{\cdot}2 \ . 10^{-7}$ |
| $^{1}/_{4}$ | $0{\cdot}50 . 10^{-7}$ | $0{\cdot}60 . 10^{-7}$ |
| $^{1}/_{8}$ | $0{\cdot}25 . 10^{-7}$ | $0{\cdot}30 . 10^{-7}$ |
| $^{1}/_{16}$ | $0{\cdot}12 . 10^{-7}$ | $0{\cdot}15 . 10^{-7}$ |
| $^{1}/_{32}$ | $0{\cdot}61 . 10^{-8}$ | $0{\cdot}75 . 10^{-8}$ |

Wir reichen also mit

| | | | |
|---|---|---|---|
| Salzsäure von . . . . . . . . | mehrfach normal | bis | $10^{-3}$ |
| Essigsäure von . . . . . . . . | $0{\cdot}4 . 10^{-2}$ | „ | $10^{-4}$ |
| Acetatgemischen ca. von . . . . | $0{\cdot}5 . 10^{-3}$ | „ | $0{\cdot}5 . 10^{-6}$ |
| Phosphatgemischen ca. von . . . | $0{\cdot}8 . 10^{-5}$ | „ | $0{\cdot}8 . 10^{-8}$ |
| Ammoniumgemischen ca. von . . | $0{\cdot}4 . 10^{-7}$ | „ | $0{\cdot}4 . 10^{-10}$ |
| Ammoniak ca. von . . . . . . | $0{\cdot}5 . 10^{-10}$ | „ | $1{\cdot}8 . 10^{-12}$ |
| Natronlauge von . . . . . . | $10^{-11}$ | abwärts. | |

Die einzelnen Bereiche überkreuzen sich zum Teil, so daß wir im Stande sind, viele $H^{\cdot}$-Konzentrationen auf verschiedene Weise herzustellen. Das ist unter Umständen von Wichtigkeit, wenn man nachweisen will, daß irgend eine Reaktion nur von der $H^{\cdot}$-Konzentration abhängt und von der sonstigen Beschaffenheit der Lösung nicht beeinflußt wird.

Außer den hier genannten Regulatoren hat *Sörensen*[1]) noch eine Reihe anderer angegeben:

Glykokoll + Salzsäure,
Natriumcitrat + Salzsäure,
Natriumcitrat + Natronlauge,
Borat + Salzsäure,
Glykokoll + Natronlauge.

Diese umfassen zum Teil nicht so große Bereiche wie die oben empfohlenen, zum Teil sind sie schwer zu berechnen und müssen empirisch mit Hilfe von $H^{\cdot}$-Konzentrationsketten sehr genau geaicht werden. Diese Aichungen hat *Sörensen* (l. c.) in einer vorzüglichen Tafel graphisch dargestellt, welche auch in vergrößertem Maßstabe besonders erschienen ist.[2])

[1]) *S. P. L. Sörensen,* Enzymstudien, II. Biochem. Zeitschr., Bd. **21**, S. **131** (1909).
[2]) *Sörensen,* Kurventafel. Verlag von J. Springer, Berlin. Preis: 1·60 Mk.

Als physiologisch besonders wichtiges Beispiel sei die Aufgabe gestellt, eine Flüssigkeit von der **Alkalität des Blutes** herzustellen. Die $H^{\cdot}$-Konzentration des Blutes bei mittlerer $CO_2$-Spannung kann als $0{\cdot}35 \,.\, 10^{-7}$ normal angenommen werden, und zwar ist $[H^{\cdot}]$ fast unabhängig von der Temperatur. $[OH']$ wird daher mit steigender Temperatur erheblich größer. Wollen wir $[H^{\cdot}] = 0{\cdot}35 \,.\, 10^{-7}$ normal mit Hilfe eines Phosphatgemisches herstellen, so muß die Mischung sein:

$$\frac{\text{prim. Phosphat}}{\text{sekund. Phosphat}} = \underset{\text{bei } 18^0}{\frac{1}{5{\cdot}7}} \qquad \underset{\text{bei } 37^0}{\frac{1}{6{\cdot}9}}$$

Benutzen wir ein Acetatgemisch, so ist

$$\frac{\text{Essigsäure}}{\text{Natriumacetat}} = \underset{\text{bei } 18^0 \text{ und bei } 37^0}{\frac{1}{510}}$$

und bei einem Ammoniumgemisch ist

$$\frac{\text{Chlorammon}}{\text{Ammoniak}} = \underset{\text{bei } 18^0}{\frac{109}{1}} \qquad \underset{\text{bei } 37^0}{\frac{27}{1}}$$

Da wir empfahlen, extreme Mischungsverhältnisse nicht zu benutzen, so erweist sich hierfür das Acetatgemisch als unbrauchbar, während das Ammoniumgemisch, wenigstens bei 37°, noch gerade anwendbar ist. Das beste ist jedoch das Phosphatgemisch.

---

Bisher hatten wir nur den Fall betrachtet, daß sich in der Lösung außer dem Reaktionsregulator keine Substanz befindet, die einen selbständigen Einfluß auf die $H^{\cdot}$-Konzentrationen hat: also Kohlehydrate, Neutralsalze, geringe Mengen Alkohol oder sonstiger organischer Solventien (soweit sie nämlich die Dissoziationskonstanten des Wassers und der anderen Elektrolyte noch nicht meßbar ändern). Wir stehen aber häufig vor der Aufgabe, solchen Flüssigkeiten eine bestimmte Reaktion zu erteilen, die merkliche Mengen Säure oder Alkali binden: die also selbst Acetate, Ammoniaksalze, Phosphate, Karbonate, Aminosäuren, größere Mengen Eiweiß oder Peptone u. dgl. enthalten. Hier können wir unsere Aufgabe mit einer gewissen Annäherung dadurch lösen, daß wir den Regulationsregulator in einem großen Überschuß zugeben. Das ist natürlich nur mit denjenigen Regulatoren möglich, deren absolute Konzentration beliebig geändert werden kann, ohne die Reaktion merklich zu ändern; das sind:

Acetatgemische, Phosphatgemische, Ammoniumgemische.

Man habe z. B. die Aufgabe, Blutserum auf eine $H^{\cdot}$-Konzentration von $0{\cdot}9 \,.\, 10^{-5}$ zu bringen. Dann versetze man z. B. 1 *cm*³ Blutserum mit einem

Acetatgemisch „$^1/_2$", und zwar wähle man die absolute Konzentration des Acetatgemisches so hoch, wie es die Umstände irgend erlauben, also $^1/_1$ normal, mindestens aber $^1/_7$ normal (entsprechend dem Elektrolytgehalt des Serums), und nehme soviel Kubikzentimeter davon, wie irgend möglich, soweit es eben im gegebenen Falle angängig ist, das Serum zu verdünnen. Man braucht einen um so größeren Überschuß des Regulators, je verschiedener die gewünschte $H^{\cdot}$-Konzentration von der eigenen $H^{\cdot}$-Konzentration des Serums ist.

Wenn es irgend angängig ist, entferne man die Phosphate, Karbonate etc. vorher durch Dialyse: alsdann stören nur noch die Eiweißkörper, und um deren reaktionsverändernden Einfluß zu überwinden, bedarf es nur eines geringen Überschusses des Regulators, weil ja ihr Molekulargewicht sehr groß ist. Zahlenmäßige Untersuchungen über den erforderlichen Überschuß des Regulators liegen noch nicht vor, jedoch ist dieser in dialysierten Lösungen sicherlich nur ganz unbedeutend. Bringt man den Elektrolytgehalt eines salzfrei gemachten Serums durch den Regulator etwa auf eine $^1/_7$-Normalität, so genügt dieser Überschuß stets, um mit sehr großer Annäherung die gewünschte $H^{\cdot}$-Konzentration zu erreichen. (Genauere Untersuchungen hierüber wären erwünscht.

---

# Nachträge und Berichtigungen.

## Druckfehler.

Seite 780. Zeile 4 von unten. Statt: titriert man, um die Kohlensäure zu entfernen lies **titriert man nach Abkühlen.**
„ 782. „ 16 „ oben. „ verdünnt lies: **verdampft.**
„ 798. „ 6 „ „ „ dampft lies: **erhitzt.**
„ 825. „ 4 „ unten. „ Hypojodid lies: **Hypojodit.**
„ 837. „ 1 „ oben. „ verbrauchte lies: **ermittelte, reduzierte.**
„ 847. „ 5 „ unten. „ sauren lies: **seinen.**
„ 857. „ 20 „ oben. „ 2 $cm^3$ hinzugefügt lies: 2 $cm^3$ **Wasser hinzugefügt.**
„ 1081. „ 9 „ unten muß es heißen: Glaskolben *B* von ca. **30** $cm^3$ Inhalt und nicht 15 $cm^3$ Inhalt.

## Nachträge.

Zu S. 816. Bei der quantitativen Bestimmung der Aminosäuren mittelst der Formolmethode nach *Henriques* und *Sörensen* ist zu beachten, daß bei Anwesenheit von Ammoniumsalzen die Werte für die Aminosäuren zu niedrig ausfallen. (Vgl. hierzu *L. de Jager,* Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **62**, S. 333. *W. Frey* und *A. Gigon,* Biochem. Zeitschr. Bd. **22**, S. 309; *T. Yoshida,* Biochem. Zeitschr. Bd. **23**, S. 239.) Diese Fehlerquelle beeinflußt jedoch die Genauigkeit der Aminosäurenbestimmung im Harne unter normalen Verhältnissen nur unwesentlich, sie wird hingegen bemerkbar, wenn die peptidgebundene Stickstoffmenge im Harne, und zwar besonders im harnstoffreichen Harne zu bestimmen ist. *W. Frey* und *A. Gigon* (l. c.) und *V. Henriques* und *S. P. L. Sörensen* (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **64**, S. 120 [1909]) schlagen daher vor, das Ammoniak vor der Formoltitrierung zu entfernen. Die letztgenannten Autoren verfuhren dabei in folgender Weise. Wie bei der ursprünglichen Methode (vgl. S. 816) werden in einem 100 $cm^3$ Meßkolben 50 $cm^3$ Harn mit Phenolphtalein, Bariumchlorid und Bariumhydroxyd behandelt und bis zu 100 $cm^3$ verdünnt. Aus 80 $cm^3$ des klaren, roten Filtrats (40 $cm^3$ Harn entsprechend) wird das Ammoniak im Vakuum abdestilliert und bestimmt. Der Destillationsrückstand wird in dem Kolben in einigen Kubikzentimetern ca. normaler Salzsäure gelöst, worauf unter Evakuierung kohlensäurefreie Luft hindurchgezogen wird, um eine eventuelle Spur von Kohlensäure auszutreiben. Darauf wird die salzsaure Lösung quantitativ mittelst kohlensäurefreien Wassers in einen 100 $cm^3$ Meßkolben übergeführt. Die Flüssigkeit wird hernach mit empfindlichem Lackmuspapier als Indikator genau neutralisiert, schließlich mit kohlensäurefreiem Wasser bis zur Marke nachgefüllt. In 40 $cm^3$ der neutralen Lösung wird die Formol-

titrierung, wie S. 816 beschrieben, ausgeführt. — Bei der Bestimmung von Hippursäure und peptidgebundenem Stickstoff verfährt man wie folgt. 50 $cm^3$ Harn werden mit ca. 5 $cm^3$ ca. 5 n-Salzsäure angesäuert, 6mal zur Extraktion der Hippursäure mit Essigester geschüttelt. Der abgehobene Essigester einmal mit Wasser gewaschen, abdestilliert und der Rückstand 2—3 Stunden mit 50 $cm^3$ ca. 30%iger Salzsäure in einem langhalsigen Kjeldahlkolben auf dem Drahtnetze gelinde gekocht. Die Stickstoffmenge des so entstandenen Glykokolls läßt sich dann nach Eindampfen der Lösung auf dem Wasserbade und Neutralisation mit $^1/_5$ n-Natronlauge (gegen Lackmuspapier) durch Formoltitration bestimmen. — Der hippursäurefreie Harn wird nun mit 50 $cm^3$ konzentrierter Salzsäure versetzt und (in einem langhalsigen Kjeldahlkolben auf dem Drahtnetze) drei Stunden lang gelinde gekocht; darauf wird die Lösung auf dem Wasserbade eingeengt. Der Rückstand wird mittelst normaler Natronlauge und möglichst wenig Wasser in einen 50 $cm^3$-Meßkolben übergeführt und mit 1 $cm^3$ Phenolphtaleinlösung und 2 *g* festem Bariumchlorid versetzt; schließlich wird mit Wasser oder mit gesättigter Barytlösung bis zur Marke nachgefüllt. Nach Umschütteln und Stehenlassen ca. 15 Minuten wird durch einen trockenen Filter filtriert, aus dem Filtrat 40 $cm^3$ in einen 100 $cm^3$-Meßkolben gebracht, die Lösung mit Salzsäure schwach angesäuert und außerdem noch 5 $cm^3$ n-Salzsäure hinzugesetzt, worauf die Flüssigkeit durch Zutröpfeln von 20 $cm^3$ ca. $^1/_3$ n-Silbernitratlösung entfärbt wird. Nach Auffüllung mit kohlensäurefreiem Wasser wird filtriert, und aus 80 $cm^3$ des Filtrats das Ammoniak ausgetrieben. Sonst verfährt man wie oben. Zur Formoltitrierung werden 50 $cm^3$ der neutralisierten Lösung (= 16 $cm^3$ Harn) verwendet. Die Differenz zwischen dem Aminosäurenstickstoff nach und vor der Salzsäurebehandlung gibt die peptidgebundene Stickstoffmenge an. — Bei der Destillation des Ammoniaks benutzten Verfasser mindestens 10 $cm^3$ einer ca. $^1/_2$ n-Lösung von Bariumhydroxyd (bei ammoniakreicher Flüssigkeit eine gesättigte Lösung) in Methylalkohol; die Destillation wird beinahe bis zur Trockene fortgeführt; bei größeren Ammoniakmengen ist es notwendig, den Destillationsrückstand in ein wenig Salzsäure zu lösen und nach Zusatz vom Überschuß an methylalkoholischer Barytlösung noch einmal beinahe bis zur Trockene zu destillieren. — Die Neutralisierung mit Lackmuspapier als Indikator muß möglichst sorgsam ausgeführt werden. Ein empfindliches Lackmuspapier wird nach *Henriques* und *Sörensen* folgendermaßen bereitet: 0·5 *g* fein gepulverten Azolithmins werden in einer Schale in 200 $cm^3$ Wasser + 22·5 $cm^3$ $^1/_{10}$ Natronlauge gelöst und nach Filtrieren 50 $cm^3$ Alkohol zugesetzt. Durch diese Lösung werden Streifen guten aschenarmen Filtrierpapiers gezogen und auf Schnüren getrocknet, was ungefähr eine Stunde in Anspruch nimmt.

Zu S. 838. Eine empfindliche Skatolreaktion beschreibt neuerdings *Takaoki Sasaki* (Biochem. Zeitschr. Bd. 23, S. 402 [1909]). Man mischt in einem Reagensglas 3 $cm^3$ Skatollösung mit 3 Tropfen Methylalkohol und unterschichtet die Lösung mit ungefähr dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure: an der Grenze beider Flüssigkeiten entsteht ein violett-roter Ring. Durchmischt man nach einigen Minuten, so wird die ganze Flüssigkeit violettrot. Empfindlichkeit der Reaktion 1 : 5000000. — Indol, Tryptophan, α-Methylindol geben die Reaktion nicht. Bei der wässerigen Suspension des Skatols versagt die Reaktion.

Zu S. 840. Zur quantitativen Indolbestimmung im Kote verfährt man nach *W. von Moraczewski* (Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 55, S. 42 [1908]) wie folgt. Man destilliert in einem Kolben von mindestens 1500 $cm^3$ 30—40 *g* Kot (mit ca. 20% Trockensubstanz) aus neutraler (oder ganz schwach alkalischer) wässeriger Lösung. Abdestillieren von $^3/_4$ der Flüssigkeit (500 $cm^3$ von 700 $cm^3$) genügt. Von den 500 $cm^3$ Destillat wird eine Durchschnittsprobe von 150 $cm^3$ genommen, mit 10 Tropfen konzentrierter Schwefel-

säure angesäuert und mit 1 *g* Kieselgur kräftig durchgeschüttelt. Von der geschüttelten Probe werden 100 $cm^3$ klar filtriert, dann fügt man 5—10 Tropfen einer 2‰igen Natriumnitritlösung hinzu und wartet das Maximum der Reaktion ab. Nach etwa 2 Stunden erreicht die Rosafärbung des Nitroindols ihr Maximum; die gefärbte Lösung kann mit einer bekannten Indollösung in einem *Wolff*schen Kolorimeter verglichen werden. Die Stammlösung, die frisch bereitet werden muß, wird folgenderweise hergestellt: Von einer 1%igen Indollösung *(Kahlbaum)* werden 1 $cm^3$ in 500 $cm^3$ Wasser gelöst, davon 5 $cm^3$ auf 100 $cm^3$ verdünnt, mit 10 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure und 5 Tropfen 2‰iger Natriumnitritlösung versetzt. 1 $cm^3$ enthält 0·00002 *g* Indol.

Zu S. 897. Bestimmung von Theophyllin und 3-Methylxanthin im Harn.[1]

Der Urin wird wie beschrieben mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit gefällt: die gesammelten Kupferoxydulniederschläge werden nach gutem Auswaschen mit heißem Wasser durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Nachdem das Filtrat vom Schwefelkupfer auf etwa 200 $cm^3$ eingedampft ist, wird es in einem Rundkolben zum Sieden erhitzt, mit einer heißen klaren Lösung von 15 *g* Barythydrat in Wasser versetzt und noch mehrere Minuten im Sieden erhalten. Der entstandene Niederschlag von 3-Methylxanthinbaryum wird nach 12stündigem Stehen abfiltriert, mit Barytwasser ausgewaschen und durch Ammonkarbonat zersetzt. Aus dem alkalischen Filtrat scheiden sich sehr bald die schönen Prismen des 3-Methylxanthins aus. Der Trockenrückstand wird in Salzsäure gelöst und die heiße Lösung mit Natronlauge bis zur schwach sauren Reaktion abgestumpft. Bei dem Erkalten scheidet sich freies 3-Methylxanthin in glänzenden Prismen ab. — Das Filtrat von 3-Methylxanthinbaryum wird mit Ammonkarbonat zur Ausfällung des Baryts versetzt und nach dem Beseitigen des Niederschlages mit Kupfersulfat und Bisulfit behandelt. Die in Freiheit gesetzten und durch Eindampfen ihrer Lösung erhaltenen Basen werden nunmehr in etwa 40 $cm^3$ Wasser gelöst und mit soviel starker Natronlauge versetzt, daß die Lösung 10% an Ätznatron enthält. Nach 24stündigem Stehen im Eisschrank wird der inzwischen ausgeschiedene kleinkristallinische Niederschlag von Theophyllinnatrium über Asbest abgesaugt und mit wenig 10%iger Natronlauge ausgewaschen. Das Theophyllinnatrium wird dann in Wasser gelöst, zur Darstellung der freien Base mit Essigsäure gesättigt und bis zur Kristallisation eingeengt; es scheidet sich dabei in zentimeterlangen, glasglänzenden Prismen ab. — Im Filtrat des Theophyllinnatriums können die übrigen Purinbasen, wie beschrieben, weiter bestimmt werden.

---

[1]) *M. Krüger* und *J. Schmid*, Der Abbau des Theophyllins, 1.3-Dimethylxanthins, im Organismus des Kindes. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **36**, S. 1 (1902).

# Register.

Die beigedruckten Ziffern bedeuten die Seitenzahlen.

## A.

## D.

## E.



## F.

## G.

## H.

## I.



## J.



## K.

## L.

## M.

## N.



## O.

## P.

## Q.



## R.



## S.

## T.

## U.



## V.



## W.



## X.



## Z.

Druck von Gottlieb Gistel & Cie. in Wien.

